

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Physiologische Funktion und pathophysiologische Relevanz des
Zwei-Poren-Kanals Typ 2 (TPC2)**

Verena Maria Schludi

aus Rosenheim

2018

Erklärung

Die Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Die Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 21.12.2017

(Verena Maria Schludi)

Dissertation eingereicht am: 21.12.2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am: 07.02.2018

*Science is not only a disciple of reason
but, also, one of romance and passion
– Stephen Hawking*

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Struktur von TPCs | 1 |
| 1.2 | Aktivatoren des TPC2 | 4 |
| 1.3 | Inhibitoren des TPC2 | 5 |
| 1.4 | Interaktoren des TPC2 | 6 |
| 1.5 | Funktion und Dysfunktion von TPCs | 6 |
| 1.5.1 | Die Regulation der Haarfarbe und der Einfluss des hTPC2 auf Pigmentierungsprozesse | 8 |
| 1.5.2 | Die Entwicklung einer Atherosklerose und die Bedeutung endolysosomaler Organellen für die Cholesterol-Homöostase | 13 |
| 2 | Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| 3 | Materialien und Methoden | 19 |
| 3.1 | Chemikalien, Lösungen und Puffer | 19 |
| 3.2 | Verwendete Mauslinien und Futter | 19 |
| 3.3 | Arbeiten mit DNA | 20 |
| 3.3.1 | Isolation von menschlicher, genomischer DNA | 20 |
| 3.3.2 | Isolation von genomischer DNA aus tierischem Gewebe | 20 |
| 3.3.3 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 20 |
| 3.3.4 | Agarose-Gelelektrophorese | 21 |
| 3.3.5 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten | 22 |
| 3.3.6 | Plasmide | 23 |
| 3.3.7 | Präparation von DNA-Fragmenten für das Klonieren und die Restriktionsanalyse | 23 |
| 3.3.8 | Dephosphorylierung und Ligation | 24 |
| 3.3.9 | Transformation bakterieller Zellen | 24 |
| 3.3.10 | Isolation der Plasmid-DNA | 25 |
| 3.3.11 | DNA Quantifizierung und Sequenzierung | 26 |
| 3.3.12 | Einführung und Entfernung von Mutationen in DNA-Konstrukte | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.3.13 | Verwendete Konstrukte: hTPC2 und hmTOR..... | 27 |
| 3.4 | Zellkultur..... | 27 |
| 3.4.1 | Kultivierung von Säugetierzellen | 27 |
| 3.4.2 | Transfektion von HEK293-Zellen | 28 |
| 3.5 | Lebendzell-Mikroskopie | 29 |
| 3.5.1 | Konfokalmikroskopie | 29 |
| 3.5.2 | Der Korrelationskoeffizient nach Pearson | 30 |
| 3.6 | Arbeiten mit Proteinen | 30 |
| 3.6.1 | Isolation und Quantifizierung von Proteinen | 30 |
| 3.6.2 | Endolysosomale Membranpräparationen | 31 |
| 3.6.3 | De-Glycosylierung..... | 32 |
| 3.6.4 | Coimmunopräzipitation (Co-IP) | 33 |
| 3.6.5 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 33 |
| 3.6.6 | Westernblot..... | 35 |
| 3.7 | Förster-Energie-Resonanz-Transfer (FRET)..... | 37 |
| 3.8 | Elektrophysiologie | 41 |
| 3.9 | Blut- und Organentnahme..... | 41 |
| 3.10 | Histologische Analyse der atherosklerotischen Plaques | 42 |
| 3.10.1 | Gefrierschnitte..... | 42 |
| 3.10.2 | <i>En face</i> Lipidfärbung | 43 |
| 3.10.3 | Öl-Rot-O-Färbung von Gefrierschnitten | 43 |
| 3.10.4 | Auswertung von histologischem Material | 45 |
| 3.11 | Statistik..... | 45 |
| 4 | Ergebnisse | 47 |
| 4.1 | Der Einfluss des hTPC2 auf die Haarfarbe | 47 |
| 4.1.1 | Subzelluläre Lokalisation, Expressionslevel, Vacuolin-Effekt und Dimerisierung der verschiedenen hTPC2-Varianten in HEK293-Zellen..... | 47 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.2 | Die Sensitivität der verschiedenen hTPC2-Varianten gegenüber dem Aktivator PI(3,5)P ₂ in HEK293-Zellen..... | 51 |
| 4.1.3 | Die Sensitivität der verschiedenen hTPC2-Varianten gegenüber den Inhibitoren ATP/ mTOR in HEK293-Zellen..... | 52 |
| 4.1.4 | Die endogene Aktivität des hTPC2 in Endolysosomen humaner Fibroblasten | 57 |
| 4.2 | Der Einfluss des mTPC2 auf die Entstehung einer Atherosklerose..... | 60 |
| 4.2.1 | Vergleich von TPC2-/-ApoE-/- Mäusen mit ApoE-/- Kontrollmäusen | 60 |
| 4.2.2 | Vergleich von TPC2-/- Mäusen mit TPC2-WT Mäusen nach Fütterung mit einer fettreichen Diät..... | 64 |
| 5 | Diskussion..... | 66 |
| 5.1 | Die mit blonder Haarfarbe korrelierenden hTPC2-Varianten zeigen eine erhöhte Kanalaktivität | 66 |
| 5.1.1 | Steigerung der hTPC2-Aktivität aufgrund des M484L Polymorphismus | 66 |
| 5.1.2 | Steigerung der hTPC2-Aktivität aufgrund des G734E Polymorphismus | 68 |
| 5.1.3 | Physiologische Konsequenzen einer veränderten hTPC2-Aktivität | 70 |
| 5.2 | Erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Atherosklerose durch den Verlust der mTPC2-Aktivität..... | 72 |
| 6 | Zusammenfassung | 74 |
| 7 | Anhang | 83 |
| 7.1 | Abkürzungen | 83 |
| 7.2 | Verwendete Primer..... | 88 |
| 7.3 | Verwendete Antikörper | 89 |
| 7.4 | Publikationen | 90 |
| 7.5 | Danksagung | 91 |

1 Einleitung

Ionenkanäle vermitteln den transmembranären Ionenfluss und sind daher essentiell für die Funktion aller bekannten Zelltypen. Sie befinden sich nicht nur in der Plasmamembran, die den intrazellulären vom extrazellulären Raum abgrenzt, sondern auch in der Membran vieler intrazellulärer Organellen. Da es technisch sehr viel schwieriger ist, die im Lumen der Zelle lokalisierten Kanäle zu untersuchen, ist wenig über ihre Eigenschaften und Funktionen bekannt. Dies gilt im Besonderen für Kanäle, die sich in der Membran des kleinsten Organells, des Lysosoms, befinden. In dieser Arbeit wurde der Zwei-Poren-Kanal Typ 2 (TPC2) untersucht, der hauptsächlich in der Membran von sauren Organellen wie Endolysosomen oder Melanosomen vorkommt.

1.1 Die Struktur von TPCs

In Vertebraten umfasst die TPC-Familie drei Vertreter: TPC1, TPC2, TPC3. Menschen und Mäuse besitzen nur 2 TPC-Gene, die für ein funktionelles Protein codieren (TPCN1 und TPCN2). TPCN3 stellt ein Pseudogen dar (Brailoiu, Hooper, et al. 2010).

Zwei-Poren-Kanäle (TPCs) sind wichtige Mitglieder einer Super-Familie von eukaryotischen, spannungs- oder ligandgesteuerten Kationenkanälen. Die Aminosäuresequenz der Porenregion der TPCs weist eine starke Homologie mit der der „transient receptor potential“ (TRP) Kanäle auf (Abb.1). TPCs entstanden in der Evolution vermutlich durch eine intragenetische Duplikation einer aus 6 Transmembransegmenten (S1- S6) bestehenden Untereinheit. Sie werden evolutionär als Intermediate zwischen den monomeren, aus vier Domänen bestehenden Natrium/ Calcium Kanälen (Na_v , Ca_v) und den tetrameren, aus einer Domäne bestehenden Kalium/ Natrium Kanälen (TRP, CatSper, K_v) angesehen (Patel 2015). Eine Domäne besteht aus sechs transmembranären α -Helices. Bei TPC1/2 sind bereits zwei Domänen genetisch fusioniert (Abb. 2A), funktionelle Kanäle bilden Dimere.

Die Strukturaufklärung des *Arabidopsis thaliana* (At)TPC1 im vergangenen Jahr lieferte die Grundlage für ein besseres Verständnis der Ionenpermeabilitäten und der Mechanismen der Kanalaktivierung und -inhibierung (Guo et al. 2016; Kintzer and Stroud 2016). Die S1- S4 Segmente dienen als Spannungssensor. Dieser ist allerdings nur im TPC1 funktionell (Abb 2B). Der Durchtritt von Ionen kann durch die S6-Transmembransegmente, welche die Pore auskleiden, reguliert werden (Guo et al. 2016).

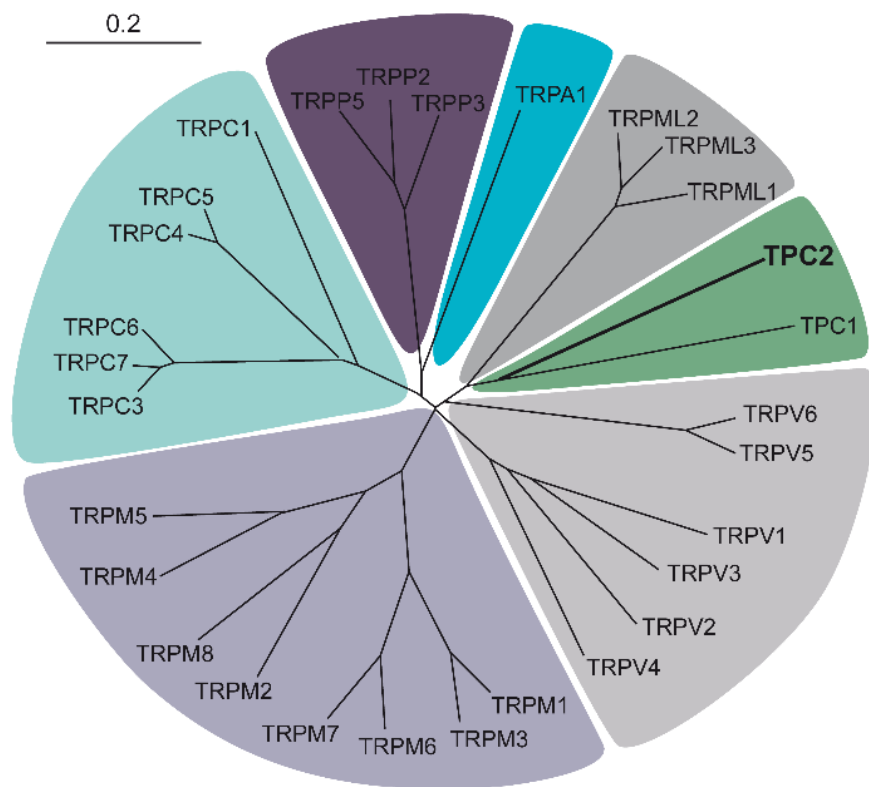


Abb. 1 Der TPC2 als Teil der TRP-Kanal Superfamilie

Die phylogenetische Analyse der Porenregion von humanen TRP-Kanälen und verwandten Kanälen basierend auf ihrer Homologie der Aminosäuresequenzen (TRPs: Transmembransegment S5, Porendomäne, Transmembransegment S6; TPCs: die entsprechenden Regionen der Domäne II). Die Skalierung gibt den Grad der genetischen Divergenz in willkürlicher Einheit (a. u.) an. Adaptiert nach der Vorlage von (Grimm and Cuajungco 2014).

Die Selektivität eines Kanaldimers wird durch die 4 P-Loops bestimmt, die zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6 lokalisiert sind. Im Gegensatz zum unselektiven AtTPC1 leitet der humane TPC2 bevorzugt Na^+ . Für die Ionenselektivität sind 2 Aminosäuren der P-Loops essentiell: Die Asparaginsäure-630-Reste (N630) verringern den Durchtritt größerer Ionen, wohingegen die Valin-629-Reste (V629) den Filter stabilisieren (Abb. 2C) (Guo, Zeng, and Jiang 2017). In geringerem Maße ist der TPC2 auch permeabel für weitere Kationen wie Ca^{2+} , K^+ , Li^+ , Rb^+ und Cs^+ (Guo, Zeng, and Jiang 2017; Schieder et al. 2010b; Pitt et al. 2010; Brailoiu, Rahman, et al. 2010; Chao et al. 2017).

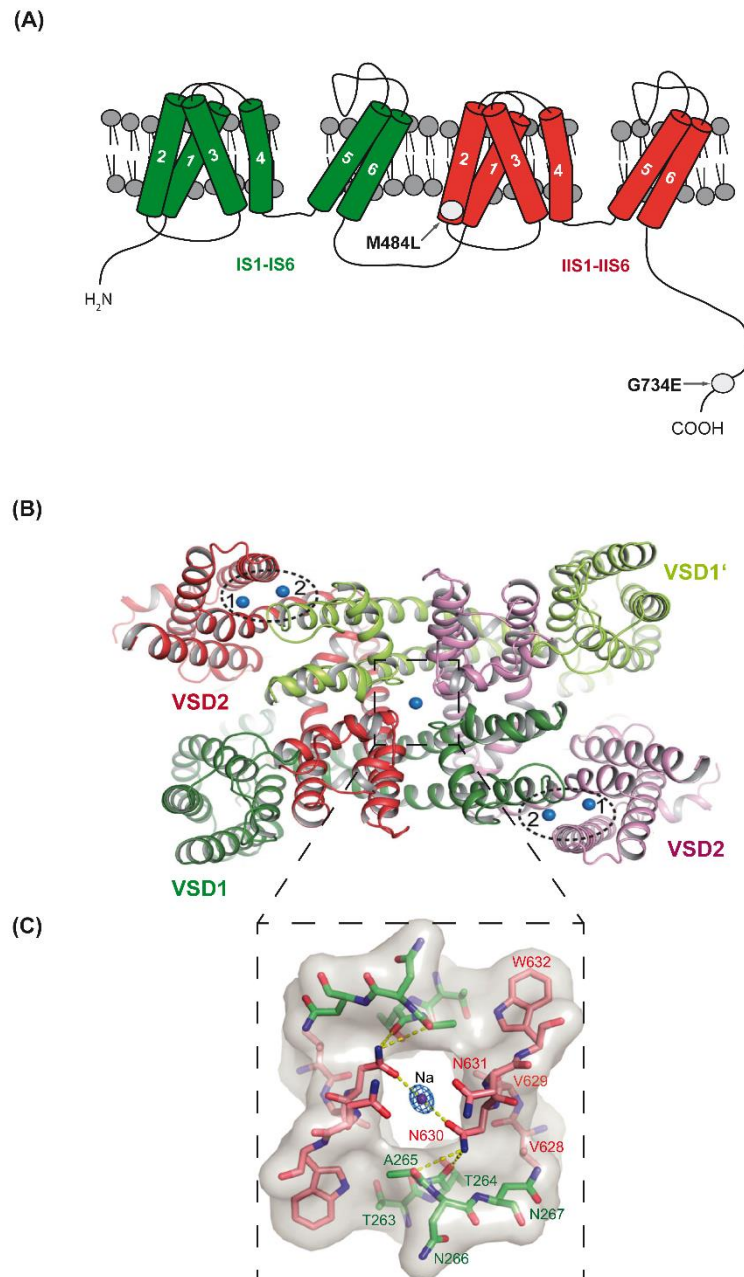


Abb. 2 Die Struktur von TPCs

(A) Topologie-Diagramm des TPC2. Die ungefähre Position der Polymorphismen M484L und G734E ist hervorgehoben. (B) Die Kristallstruktur des AtTPC1, hier von der luminalen Seite aus betrachtet dargestellt. Die ersten 6 Transmembransegmente einer Untereinheit sind grün (IS1-IS6), die zweiten 6 Transmembransegmente rot (IIS1-IIS6). Die Transmembransegmente der anderen Untereinheit sind lindgrün und purpurrot. Der Spannungssensor befindet sich in S1-S4 (VSD, voltage sensing domain). Die zwei luminalen Bindungsstellen des AtTPC1 für Ba^{2+} (blaue Bereiche, mit 1 und 2 gekennzeichnet) sind eingekreist (Guo et al. 2016). (C) Vergrößerung der Porenregion von A, wobei hier die 3 relevanten Aminosäuren jedes Selektivitätsfilters durch die des humanen TPC2 ersetzt wurden (Guo, Zeng, and Jiang 2017).

1.2 Aktivatoren des TPC2

Es sind 2 Agonisten des TPC2 bekannt: Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P₂) und Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NAADP).

Phosphoinositide sind saure Phospholipide, die in der Plasmamembran und in den internen Membranen endolysosomaler Organellen und des Golgi-Komplexes vorkommen. PI(3,5)P₂ ist überwiegend in Endolysosomen lokalisiert. Es entsteht durch die Phosphoinositid-5-Kinase PIKfyve, welche PI(3)P phosphoryliert. Die 5-Phosphatase Fig4 kann sowohl die Aktivität von PIKfyve regulieren, als auch PI(3,5)P₂ hydrolysieren (Shen, Wang, and Xu 2011). Phosphoinositide können Ionenkanäle regulieren, indem sie entweder direkt binden oder Regulatoren rekrutieren. Signalwege, die die PI(3,5)P₂-Menge beeinflussen, verändern dementsprechend auch die Kanalaktivität. PI(3,5)P₂ aktiviert endolysosomale Ionenkanäle wie TPC2 und den „transient receptor potential“ Kanal Mucolipin-1 (TRPML1). Die Aktivierung von TRPML1 erfolgt über eine direkte Bindung von PI(3,5)P₂ an den N-Terminus des Kanals. Dabei gehen positiv geladene Aminosäuren eine elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des PI(3,5)P₂-Moleküls ein. Zu einer spezifischen Bindung von PI(3,5)P₂ tragen möglicherweise zudem noch weitere hydrophobe Aminosäurereste bei, die an den lipophilen Teil des Phosphoinositids binden (Dong et al. 2010). Der Mechanismus der Regulation der TPCs durch PI(3,5)P₂ ist bisher nicht bekannt (McCartney, Zhang, and Weisman 2014).

Der TPC2 kann neben PI(3,5)P₂ auch durch NAADP aktiviert werden. NAADP ist ein second messenger, der ursprünglich in Seeigel-Eiern entdeckt wurde (Galione, Patel, and Churchill 2000). Die NAADP-Synthese erfolgt durch das Enzym CD38 und kann durch G-Protein gekoppelte Signalwege reguliert werden (Aarhus et al. 1995; Yamasaki, Churchill, and Galione 2005). Es gibt Hinweise, dass NAADP ein Agonist von TPC-Komplexen ist und eine Ca²⁺-Freisetzung auslöst (Zong et al. 2009; Pitt et al. 2010). Wahrscheinlich ist, dass ein bisher noch nicht identifiziertes Protein an den TPC bindet und er nicht selbst der Rezeptor für NAADP ist (Lin-Moshier et al. 2012; Walseth et al. 2012). Die NAADP-abhängige Ca²⁺-Freisetzung ist konzentrationsabhängig, die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt einen charakteristischen, glockenförmigen Verlauf. Unter physiologischen NAADP-Konzentrationen im nanomolaren Bereich wird der TPC2 aktiviert (Aktivierungsmaximum: 30 nM), im mikromolaren Konzentrationsbereich erfolgt eine Inaktivierung (Zong et al. 2009). Ein primärer Ca²⁺-Einstrom durch TPCs in das Zytosol kann eine sekundäre Ca²⁺-Freisetzung durch Aktivierung von Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums triggern (Calcium-induzierte Calciumfreisetzung, CICR) (Kinnear et al. 2004)

1.3 Inhibitoren des TPC2

Pharmakologisch kann der TPC2 durch Ned-19 oder Tetrandrin inhibiert werden (Pitt et al. 2010; Sakurai et al. 2015).

Endogen wird die Kanalaktivität durch ATP reguliert. ATP im Zytosol verringert den Ionenstrom, wobei diese Sensitivität $PI(3,5)P_2$ - und NAADP-unabhängig ist (Cang et al. 2013). Der Mechanismus der ATP-Inhibition ist noch nicht vollständig verstanden. Wahrscheinlich bindet ATP nicht direkt an den Kanal, sondern vermittelt eine Phosphorylierung durch Kinasen. Es gibt Hinweise darauf, dass eine dieser Kinasen mTOR (mammalian/ mechanistic Target of Rapamycin) ist (Abb. 3) (Cang et al. 2013; Jha et al. 2014).

Rapamycin (Syn. Sirolimus) bzw. der Rapamycin-FKBP12-Komplex fungiert als mTOR-Inhibitor, indem er den Zugang zum aktiven Zentrum von mTOR einschränkt. Torin-2 hemmt mTOR durch einen ATP-kompetitiven Mechanismus (Yang et al. 2013).

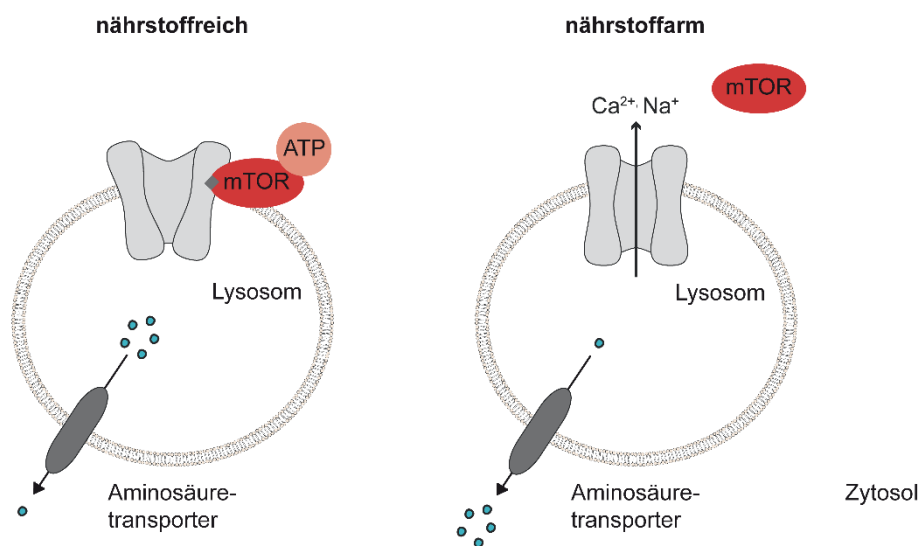


Abb. 3 Kinasen wie mTOR sind für die ATP-Sensitivität des TPC verantwortlich

Eine Rekrutierung der Serin-Threonin-Kinase mTOR aus dem Zytosol an die endolysosomale Membran kann unter anderem durch Nährstoffe und kleine GTPasen (Rags) stimuliert werden (Betz and Hall 2013). Die Interaktion mTORs mit dem TPC führt zu einer Hemmung der Aktivität des Ionenkanals. Somit kann mTOR die TPC-Funktion und damit beispielsweise auch das endolysosomale Membranpotential und die Aminosäure-Homöostase regulieren (Cang et al. 2013). Adaptiert nach einer Vorlage von (Cang et al. 2013).

1.4 Interaktoren des TPC2

An der endolysosomal Membran sind TPCs in einen Netzwerk eingebettet, das weitere Proteine umfasst. In zwei unabhängigen, massenspektrometrischen Analysen des TPC2-Interaktoms wurden neben Proteinen der vesikulären Fusionsmaschinerie (Rab-Proteine, Syntaxine) auch bereits bekannte Interaktionspartner wie das anti-apoptotische Protein Hax-1 und mTOR gefunden (Lin-Moshier et al. 2014; Grimm et al. 2014). Für folgende Proteine des TPC2-Komplexes konnte zudem eine direkte Interaktion mit dem Ionenkanal mittels Förster-Energie-Resonanz-Transfer- (FRET) oder Coimmunopräzipitations-Experimenten bestätigt werden: Rab-5, 7, 11, Syntaxin 6/ 7, die Kinasen mTOR und LRRK2, Hax-1 und TRPML1 (Grimm et al. 2014; Lin-Moshier et al. 2014; Lam et al. 2013; Gomez-Suaga et al. 2012; Yamaguchi et al. 2011). In welcher Form die Interaktionspartner Kanaleigenschaften wie den Porendurchmesser und die Konformation verändern, ist noch nicht bekannt.

1.5 Funktion und Dysfunktion von TPCs

TPCs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des endolysosomal Transports, der Homöostase verschiedener Nährstoffmoleküle, der Signaltransduktion, der Autophagie, der Zelldifferenzierung und der Pigmentierung.

Die TPC2-Aktivität ist besonders für Trafficking-Prozesse später Endosomen und Lysosomen von Bedeutung. Es gibt Hinweise darauf, dass der TPC2 die Fusion dieser Organellen vermittelt.

Sowohl Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) als auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) akkumulieren in späten Endosomen von TPC2-defizienten (TPC2^{-/-}) Zellen (embryonale Maus Fibroblasten (MEFs) oder Hepatozyten) (Sakurai et al. 2015; Grimm et al. 2014). Auch zeigen TPC2^{-/-} MEFs eine langsamere Kinetik des Ligand-induzierten Abbaus des Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptors (PDGFR), da dieser vom Transport von der Plasmamembran zu den Lysosomen abhängt (Ruas et al. 2014). Filoviren wie der Ebola- und der Marburg-Virus werden via Makropinozytose in die Wirtszelle aufgenommen und zu endolysosomal Organellen transportiert. Aufgrund gestörter Fusionsprozesse mit Lysosomen bei einem TPC2-Knockout oder einer pharmakologischen TPC2-Blockade wird der Austritt der Viren ins Zytoplasma via Niemann-Pick C1 (NPC1) Transporter erschwert. Die Konsequenz ist eine Akkumulation der Viren in späten Endosomen und eine verminderte Infektion (Sakurai et al. 2015). Dagegen ist in den Transport von Stoffen, die von der Plasmamembran über frühe Endosomen zum Golgi-Apparat transportiert werden (z.B. Cholera toxin-B), überwiegend der TPC1 involviert (Ruas et al. 2014; Ruas et al. 2010). Zudem

kommt es durch den Verlust beider humaner TPCs zu einer Akkumulation von Integrinen in frühen Endosomen, wodurch die Migration metastasierender Krebszellen verringert werden kann (Nguyen et al. 2017). Auch in Brustkrebszellen wird eine Beeinflussung von Signalwegen durch den TPC2 postuliert (Jahidin et al. 2016).

Des Weiteren sind TPCs für die Aminosäure-, Glucose- und die Lipid-Homöostase von Bedeutung.

Endolysosomen besitzen die Fähigkeit, Veränderungen der Nährstoff-Level zu erkennen und darauf zu antworten. Bei einem Nährstoff-Mangel kommt es zu einem Abfall der ATP-Konzentrationen, einer Translokation mTORs ins Zytosol, einer Öffnung von TPCs und einem verstärktem Ausstrom von Aminosäuren (Abb. 3) (Cang et al. 2013).

Zudem tragen TPCs (insbesondere der TPC1) zur Glucose-Homöostase bei. Sie spielen bei der Insulinsekretion eine Rolle, welche durch eine Depolarisation der β -Zellen des Pankreas induziert wird (Arredouani et al. 2015; Cane et al. 2016).

Die Auswirkung des Verlusts des TPC2 auf die Lipid-Homöostase äußert sich in MEF-Zellen in einer Cholesterol-Akkumulation, in Mäusen in einer Anreicherung von Fett-Vakuolen in der Leber oder auch einer Adipositas mit vergrößerten Adipozyten im weißen Fettgewebe und einer erhöhten Anzahl kleiner Lipidtropfen im braunen Fettgewebe (Grimm et al. 2014; Lear et al. 2015).

Des Weiteren spielen TPCs bei der Übertragung von Ca^{2+} -Signalen in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien, des Magens, der Blase, in Herzmuskelzellen und Endothelzellen eine Rolle.

In glatten Muskelzellen löst der Parasympathikus eine Kontraktion aus, an der auch der Ca^{2+} -permeable TPC beteiligt ist (Tugba Durlu-Kandilci et al. 2010). In Herzmuskelzellen trägt eine Ca^{2+} -Freisetzung durch TPCs zur positiv inotropen Wirkung des Sympathikus bei. Durch das Fehlen des TPC2 kommt es daher zu einer abgeschwächten Antwort auf β -Adrenozeptor-Stimulationen, die mit einer verringerten Neigung zu Arrhythmien und zur Entwicklung einer Hypertrophie einhergeht (Capel et al. 2015).

Eine durch den Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) vermittelte Aktivierung seines Rezeptors (VEGF-R2) führt in Endothelzellen zu einer NAADP- und TPC2-abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus endolysosomalen Organellen. Dieser Signalweg kann die Neoangiogenese beeinflussen (Favia et al. 2014).

Darüber hinaus wurde ein Einfluss des TPC2 auf die Regulation der Makroautophagie beschrieben. In HeLa- (Henrietta Lacks) Zellen induziert eine Überexpression des TPC2 eine Akkumulation reifer Autophagosomen durch die Hemmung der Fusion von Autophagosomen

mit Lysosomen, hemmt jedoch dabei keine generellen, endolysosomalen Abbauprozesse (Lu et al. 2013). Auch in Astrozyten stimuliert eine Aktivierung von TPCs durch Glutamat/ NAADP die Autophagie (Pereira et al. 2017; Pereira et al. 2011). Das Zusammenspiel des TPC2 mit einer Variante der Leucin-reichen Repeat Kinase (LRRK2-G2019S), die zur Parkinson-Krankheit führt, verursacht fehlregulierte Ca^{2+} -Signale. Die Konsequenz ist ein Defekt in der Morphologie der Lysosomen und eine Akkumulation von Autophagosomen (Hockey et al. 2015).

Dagegen treten bei TPC2^{-/-} Mäusen Autophagie-Prozesse schneller und häufiger auf, der lysosomale pH-Wert ist alkalischer und die Aktivität lysosomaler Enzyme verringert (Lin, Duann, et al. 2015). Auch die im Presenilin-defizienten Alzheimer-Modell beeinträchtigte lysosomale Proteolyse und Makroautophagie kann zum Teil durch eine verringerte lysosomale Ca^{2+} -Speicherung und eine veränderte Expression der TPCs erklärt werden (Neely Kayala et al. 2012).

Darüber hinaus sind TPCs an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt. Eine Herunterregulation des TPC2 hemmt die Osteoklastogenese (Notomi, Ezura, and Noda 2012). Der Einfluss des TPC2 auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Neuronen ist dagegen je nach Zeitpunkt verschieden. Auf die initiale Differenzierung zu Progenitorzellen wirkt er hemmend, für die spätere neuronale Differenzierung wird er jedoch benötigt (Zhang, Lu, and Yue 2013). In Skelettmuskeln dagegen fördert der TPC2 vor allem die frühen Stadien der Differenzierung (Aley et al. 2010).

1.5.1 Die Regulation der Haarfarbe und der Einfluss des hTPC2 auf Pigmentierungsprozesse

2008 wurde in einer genomweiten Assoziationsstudie mit 5130 isländischen und niederländischen Individuen zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen dem TPC2-Gen (TPCN2) und einem Haarphänotypen beobachtet. 2 codierende Varianten des TPC2 kamen vermehrt bei Individuen mit blonder Haarfarbe vor (Sulem et al. 2008). Ein Zusammenhang zwischen dem TPCN2-Locus und der Haarfarbe wurde auch in einer Assoziations-Analyse einer großen Kohorte (n= 25201) von Zwillingen und deren Familien aus dem niederländischen Zwillingsregister (NTR) gesehen (Lin, Mbarek, et al. 2015). Verschiedene Haarfarben kann man vor allem bei Europäern beobachten, bei anderen Bevölkerungsgruppen ist die dominierende Haarfarbe schwarz (Kenny et al. 2012). Die unterschiedlichen Pigmentierungs-Phänotypen sind das Ergebnis verschiedener Kombinationen an Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in Pigmentierungsgenen (Ito et

al. 2013). SNPs in der genomischen DNA führen zu Veränderungen in der Expression oder Funktion der von ihnen codierten Proteine. Bisher wurden in genomweiten Assoziationsstudien neben TPCN2 weitere Gene gefunden, die mit blonder Haarfarbe in Europäern assoziiert sind (Tabelle 1):

Tabelle 1

| Gen | Mechanismus | Quelle |
|---|---|--|
| Interferon-Regulationsfaktor 4 (IRF4) | Beeinflussung der Bindung des Transkriptionsfaktors TFAP2A; dadurch Veränderung der gemeinsam mit MITF gesteuerten Tyrosinase-Expression; | (Praetorius et al. 2013; Han et al. 2008; Sulem et al. 2007; Lin, Mbarek, et al. 2015) |
| Kit Ligand (KITLG) | Beeinflussung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle (für LEF), die dem KITLG-Gen vorgelagert ist, und damit der KITLG-Expression; dadurch Veränderung der Stimulation des Transkriptionsfaktors MITF; | (Guenther et al. 2014; Lin, Mbarek, et al. 2015) |
| E3 Ubiquitin-Protein Ligase (HERC2)/ P-Protein (OCA2) | HERC-Gen dem OCA2-Gen vorgelagert; Beeinflussung der Bindung von Transkriptionsfaktoren (HLTF, LEF1, MITF) und damit der OCA2-Expression/ des pH-Werts; | (Visser, Kayser, and Palstra 2012; Han et al. 2008; Sulem et al. 2007) |
| SLC-Transporter 24 Mitglied 4 (SLC24A4) | K ⁺ -abhängiger Na ⁺ / Ca ²⁺ Austauscher; Beeinflussung der Melanin-Produktion durch die Regulation des pH-Werts; | (Sulem et al. 2007) |
| SLC-Transporter 45 Mitglied 2 (SLC45A2), | Membran-assoziiertes Transportprotein (MATP), H ⁺ -Sucrose-Symporter; Beeinflussung der Melanin-Produktion durch die Regulation des pH-Werts; | (Han et al. 2008; Bin et al. 2015) |
| Endothelin Rezeptor Typ B (EDNRB) | G-Protein gekoppelter Rezeptor; Beeinflussung der Stimulation des Transkriptionsfaktors MITF; | (Zhang et al. 2013; Hou et al. 2004) |

Beim Erwachsenen sind für Haar-, Haut- und Augenfarbe Pigment-produzierende Melanozyten verantwortlich. Diese sind in der Basalschicht der Epidermis, im Bereich der Haarzwiebel oberhalb der Haarpapille und in der Iris zu finden. In den Melanozyten wird Melanin in den Melanosomen gebildet (Wasmeier et al. 2008). Der TPC2 ist in nicht-pigmentierten Zellen in der endolysosomalen Membran lokalisiert, in Melanozyten dagegen vorwiegend in der Membran der Melanosomen (Ambrosio et al. 2016; Bellono, Escobar, and Oancea 2016). Haar-Melanozyten geben ihr Pigment an ihre Nachbarzellen, die Keratinozyten des Haar-Kortex, ab. Dies führt zu einer Pigmentierung des Haarschafts (Ito et al. 2013). In der Haarzwiebel beträgt das Verhältnis von Melanozyten zu Keratinozyten 1:5 (Barsh and Cotsarelis 2007; Slominski et al. 2005). Die Anatomie eines Haares und die Lokalisation Melanin-produzierender Melanozyten sind in Abbildung 4 dargestellt.

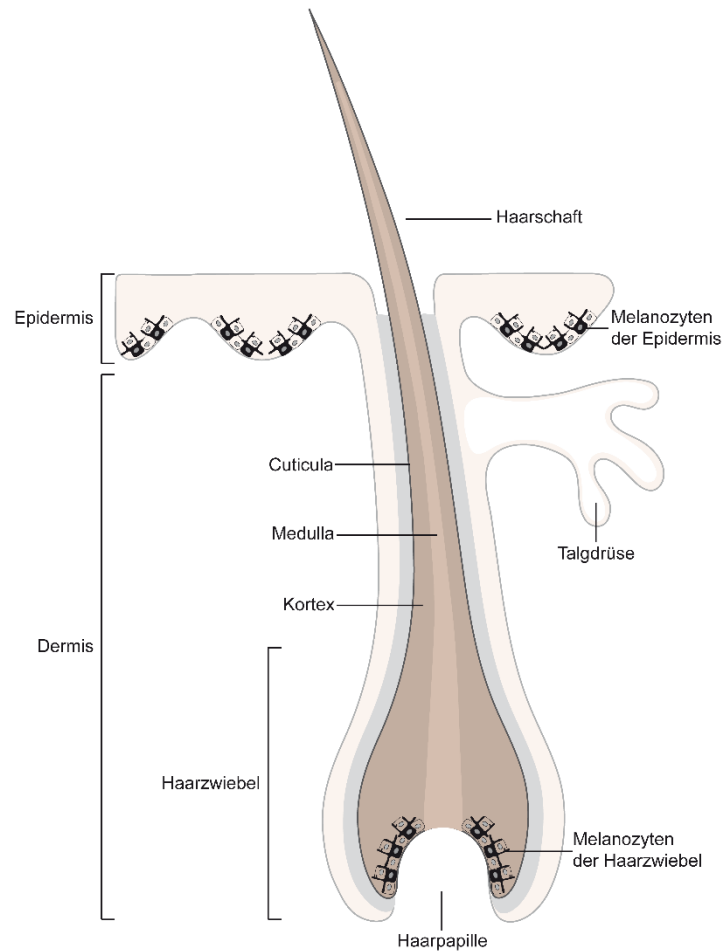


Abb. 4 Der Aufbau eines Haares

Längsschnitt eines Haares und der Haut mit Pigment-bildenden Melanozyten. Der Melanin-Transfer der Melanozyten der Haarzwiebel an benachbarte Keratinozyten des Kortex führt zur Pigmentierung des Haarschafts.

Melanozyten, die in unterschiedlichen Kompartimenten (Haar, Auge, Haut) zu finden sind, stellen unabhängige Zellpopulationen mit verschiedenen Regulationsmechanismen und Signalwegen dar (Van Raamsdonk et al. 2009). Die Mechanismen der Melanogenese und des Transfers der Melanosomen zu den Keratinozyten scheinen bei Haut und Haaren ähnlich zu sein (Slominski et al. 2005). Im Gegensatz zur Haut läuft in den Haaren die Melanogenese jedoch nicht kontinuierlich, sondern nur in der Anagen-Phase des Haarzyklus ab (Tobin 2011). Zudem enthalten Haar-Melanozyten eine höhere Anzahl großer und reifer Melanosomen, deren Anfälligkeit für Degradierungs-Prozesse gering ist (Tobin 2011; Ebanks et al. 2011). Die Farbe des menschlichen Haares wird durch die Größe der Melanosomen und durch die Menge und Art des synthetisierten Melanin-Pigments bestimmt (Rees 2003). Man unterscheidet zwei Arten von Melanin: Eu- und Pheomelanin. Je mehr Eumelanin das Haar enthält, desto dunkler ist es. Pheomelanin färbt das Haar orange/ rot (Sulem et al. 2007; Ito

et al. 2013; Kondo and Hearing 2011; Ito and Wakamatsu 2011). Typischerweise besteht Melanin aus Co-Polymeren von Eu- und Pheomelanin, wobei die Haarfarbe durch das Verhältnis der beiden Melanin-Arten bestimmt wird (Raposo and Marks 2007). Der Phänotyp blonder Haare entsteht durch eine geringe Eumelanin-Synthese (Ito and Wakamatsu 2011). Um die Unterschiede im Pigmentierungs-Phänotyp verschiedener Individuen verstehen zu können, ist eine Erforschung der Regulation der Melanogenese nötig. Der Microphthalmie-assoziierte Transkriptionsfaktor (MITF) ist ein Haupt-Regulator der Pigmentierung, er kontrolliert die Transkription vieler Pigmentgene wie auch der Tyrosinase (Wasmeier et al. 2008; Kondo and Hearing 2011). Dieses Schlüsselenzym der Melanogenese wandelt L-Tyrosin in Dopaquinon um, aus dem dann in weiteren Schritten Pheo- oder Eumelanin gebildet wird (D'Mello et al. 2016; Ito et al. 2013). Für die Pheomelanogenese ist zudem eine bestimmte Menge Cystein essentiell (Ito and Wakamatsu 2011). Unreife Melanosomen haben einen sauren pH-Wert. Da die Tyrosinase jedoch bei einem sauren pH-Wert inaktiv ist, ist ein Anstieg des pH-Werts für die Melanin-Synthese von Nöten (Bellono et al. 2014; Bellono and Oancea 2014). Die optimale enzymatische Aktivität der Tyrosinase liegt im neutralen pH-Bereich (pH~7,5). Tyrosinase ist ein Metalloprotein, das als Co-Faktor Kupfer benötigt. Ein neutraler pH ermöglicht die Bindung von Kupfer an die Tyrosinase, wodurch deren Aktivität erhöht wird (Bin et al. 2015; Ito et al. 2013). Melanosomen von dunkler/ schwarzer Haut weisen einen pH-Wert höher als pH 6 auf, wohingegen der melanosomale pH-Wert von Kaukasiern unter pH 6 liegt. Die in ihrer katalytischen Tätigkeit eingeschränkte Tyrosinase von Kaukasiern kann durch chemische Verbindungen, die den pH-Wert anheben, aktiviert werden (Fuller, Spaulding, and Smith 2001).

Die Regulation des melanosomalen pH-Werts erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel von Kanälen und Transportern. Neben der V-ATPase finden sich in der melanosomalen Membran Na^+/H^+ -Austauscher, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (SLC45A4), Zucker-Transporter (SLC45A2= MATP), Anionen-Kanäle (OCA2) und Kationen-Kanäle (TPC2) (Kondo and Hearing 2011; Ito and Wakamatsu 2011). Für eine Ansäuerung ist zum einen die V-ATPase nötig, die Protonen in das melanosomale Lumen pumpt, zum anderen ein Gegenionen-Fluss, der das durch die H^+ -Akkumulation entstandene Membranpotential wieder neutralisiert (Ishida et al. 2013). In großen Melanozyten, welche aus OA1-defizienten, murinen Melanozyten oder aus retinalen Pigmentepithel- (RPE) Zellen des amerikanischen Ochsenfrosches isoliert wurden, konnten OCA2-vermittelte Cl^- -Ströme (outward currents) und TPC2-vermittelte Na^+ -Ströme (inward currents) gemessen werden (Bellono, Escobar, and Oancea 2016). Die Änderung des Membranpotentials durch Ionenkanäle beeinflusst die V-ATPase-Aktivität (Bellono et al. 2014).

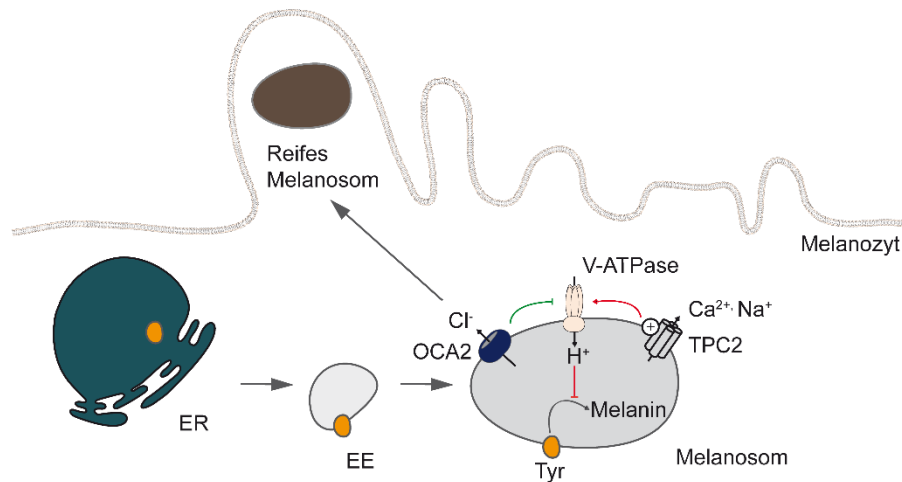


Abb. 5 Die Ionenkanal-vermittelte Regulation des melanosomalen pH-Werts und der Melanogenese

ER= endoplasmatisches Retikulum, EE= frühes Endosom, Tyr= Tyrosinase, OCA2= Cl⁻-Kanal, der nach der Krankheit Okulokutaner Albinismus Typ 2 benannt wurde

Eine verminderte TPC2-Expression (siRNA, gene editing) oder Aktivität (Inhibitoren) lässt die Melanin-Produktion ansteigen (Ambrosio et al. 2016; Bellono, Escobar, and Oancea 2016). Zudem wurde in humanen TPC2-KO-Zellen eine Zunahme der Größe, aber nicht der Anzahl reifer Melanosomen beobachtet (Ambrosio et al. 2016). Dagegen äußert sich eine TPC2-Überexpression in Säugetierzellen in einer verringerten Pigmentproduktion (Ambrosio et al. 2016). Auch bei Oozyten des Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, konnte nach Überexpression des TPC2 eine Störung der Pigmentierung in der animalen Hälfte beobachtet werden (Lin-Moshier et al. 2014). Zudem übt der TPC2 einen Einfluss auf die Entstehung von Melanomen aus (Kosiniak-Kamysz et al. 2014; Kocarnik et al. 2015).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der hTPC2 als negativer Regulator der Pigmentierung fungiert und somit ein Gegengewicht zum OCA2-Kanal darstellt (Abb. 5) (Bellono, Escobar, and Oancea 2016).

1.5.2 Die Entwicklung einer Atherosklerose und die Bedeutung endolysosomaler Organellen für die Cholesterol-Homöostase

In den westlichen Industrienationen stellt die Atherosklerose mit ihren klinischen Folgeerscheinungen (koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, zerebrale Ischämie) eine der häufigsten Todesursachen dar (Linton et al. 2000).

Die Endothelschicht der Intima ist an der Blutdruckregulation beteiligt, verhindert die Adhäsion von Proteinen und Leukozyten und sondert gerinnungshemmende Stoffe ab (Abb. 6A). Eine endotheliale Dysfunktion kann durch die Risikofaktoren einer Atherosklerose, wie eine Dyslipidämie, eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus, freie Radikale durch Rauchen oder eine Homocysteinämie verursacht und gefördert werden. Dies ermöglicht das Eindringen von Lipoproteinen und die Rekrutierung proinflammatorischer Zellen.

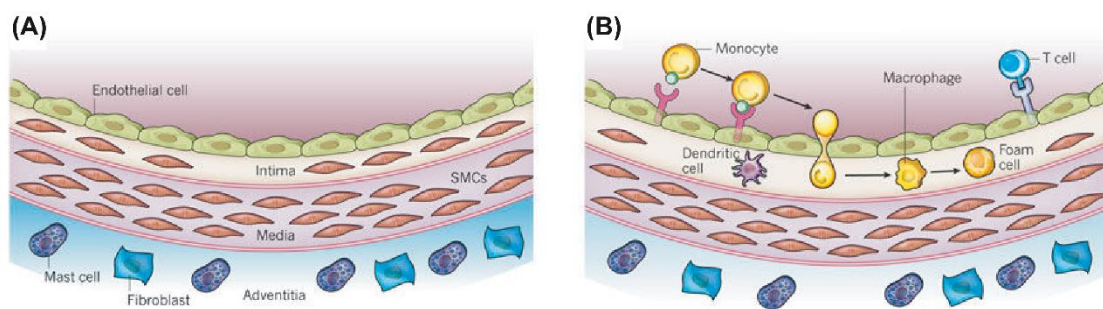


Abb. 6 Die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques (aus (Libby, Ridker, and Hansson 2011))

(A) Die normale Arterie besteht aus drei Schichten: Intima, Media, Adventitia. (B) Durch eine Ansammlung von Schaumzellen entstehen Fettstreifen.

Lipoproteine unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung aus Triglyceriden, Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen. Die Dichte steigt mit Zunahme der Protein- und Abnahme des Lipidanteils (Berneis and Krauss 2002). Lipoproteine niedriger Dichte (LDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL) und Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) können durch Oxidation modifiziert werden (Glass and Witztum 2001). Die zu Gewebemakrophagen differenzierten Monozyten und eine Untergruppe von glatten Muskelzellen (SMCs) nehmen veränderte Lipoproteine auf (Libby, Ridker, and Hansson 2011; Linton et al. 2000) und transportieren diese zu endolysosomalen Organellen (Charlton-Menys and Durrington 2008; Dubland and Francis 2015; Linton et al. 2000). Dort erfolgt die Hydrolyse der Cholesterolester (CE) zu freiem Cholesterol (FC) durch das Enzym saure, lysosomale Lipase (LAL). Die Endolysosomen müssen dabei einen sauren luminalen pH-Wert aufrechterhalten, um die

hydrolytischen Enzyme zu aktivieren und einen Abbau internalisierter Makromoleküle zu ermöglichen (Ishida et al. 2013; Dubland and Francis 2015). Für die Ansäuerung sind V-ATPasen nötig, die Protonen in das endolysosomale Lumen pumpen. Der schnelle Aufbau eines innen-positiven Potentials würde jedoch das weitere Pumpen der V-ATPasen zum Erliegen bringen. Daher ist ein paralleler Ausgleichsstrom (Einstrom von zytosolischen Anionen/ Ausstrom von luminalen Kationen) nötig, um das durch die Protonen-Akkumulation entstandene Membranpotential wieder zu neutralisieren (Steinberg et al. 2010). In den Membranen dieser endolysosomalen Organellen ist auch der TPC2 lokalisiert. Er spielt bei der Regulation von endolysosomalen Transportprozessen eine Rolle und ist für die Lipid-Homöostase von Bedeutung.

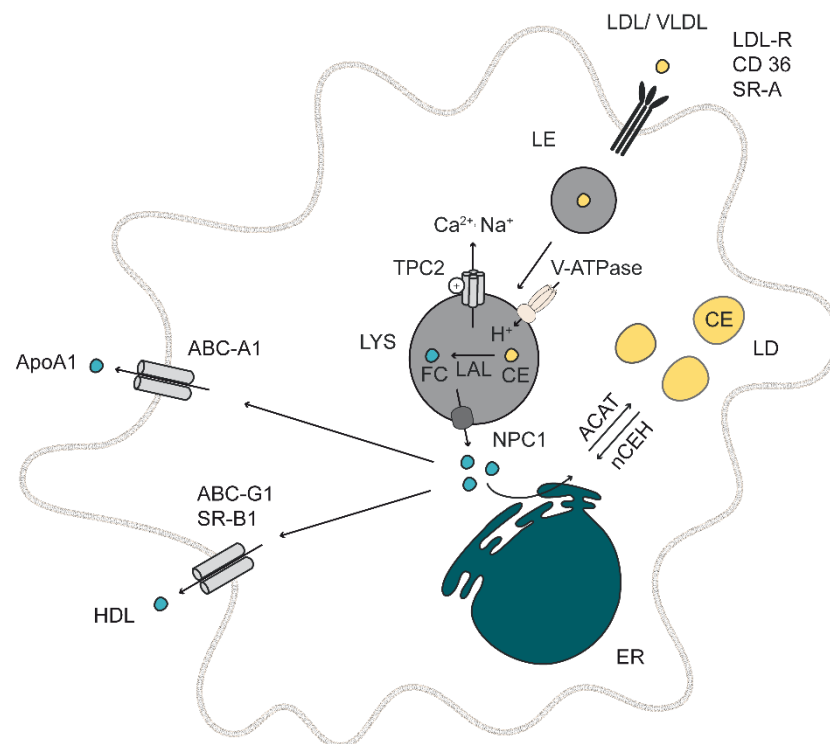


Abb. 7 Zelluläres Trafficking und Metabolismus von Lipoproteinen

LDL= Lipoprotein geringer Dichte, VLDL= Lipoprotein sehr geringer Dichte, LE= spätes Endosom, CE= Cholesterolester, FC= freie Fettsäure, LYS= Lysosom, ER= endoplasmatisches Retikulum, LAL= lysosomale, saure Lipase, ACAT= Acetyl-CoA-Acetyltransferase, nCEH= Neutrale Cholesterolester-Hydrolase, NPC1= Niemann-Pick C1, ApoA1= Apolipoprotein A1, LDL-R= LDL-Rezeptor, SR= Scavenger Rezeptor, CD= Cluster of differentiation, ABC= Transporter, die eine ATP-bindende Kassette besitzen, HDL= Lipoprotein hoher Dichte, LD= Lipidtröpfchen

Freies Cholesterol wird aus dem endolysosomalen System durch Niemann-Pick C1 (NPC) Proteine abtransportiert. Eine Akkumulation von freiem Cholesterol kann zur Bildung von Cholesterol-Kristallen (CC) in Lysosomen und einer Aktivierung des Inflammosoms führen (Tabas and Bornfeldt 2016). Der Export von Cholesterol beinhaltet möglicherweise auch die Bildung von Membran-Kontaktstellen zwischen Endolysosomen und den Akzeptor-Membranen. Die Lipide können zur Plasmamembran transportiert werden, aber auch zum endoplasmatischen Retikulum (ER) oder zu den Mitochondrien.

Die endogene Cholesterolbiosynthese findet im Zytosol und ER statt. Das für die Synthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist die Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoAR). Überschüssiges FC wirkt hemmend auf die endogene Synthese (Rodwell, Nordstrom, and Mitschelen 1976).

Im ER wird überschüssiges FC durch das Enzym Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT) wieder verestert und in Form von Lipidtropfen (LD) gespeichert (Thelen and Zoncu 2017). Eine Akkumulation dieser Cholesterolester äußert sich in einer Intima-Verfettung (fatty streak) (Abb. 6b).

Lipid-beladene Makrophagen können freies Cholesterol über ATP-binding cassette (ABC) Transporter wieder exportieren (Abb. 7). HDL-Partikel können über den Blutstrom einen reversen Cholesterol-Transport bewirken und Cholesterol von den peripheren Geweben in die Leber transportieren, wodurch eine Ausscheidung des Cholesterols möglich ist (Libby, Ridker, and Hansson 2011). Cholesterol kann sowohl zu Gallensäure umgebaut als auch in Form von freiem Cholesterol ausgeschieden, in Form von Lipoproteinen in das Blut abgegeben oder als Cholesterolester gespeichert werden (Small 1988).

Die weitere Plaque-Bildung verursacht die Wanderung von glatten Muskelzellen der Media in die Intima. Diese sind nun in der Lage zu proliferieren und extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen zu synthetisieren, die das Atherom bedecken. Durch das Absterben von Makrophagen (und einer Untergruppe von SMCs) und aufgrund der Unfähigkeit diese toten Zellen durch einen phagozytotischen Prozess, die Efferozytose, zu beseitigen kommt es zu einer Akkumulation der freiwerdenden Lipide. Es entsteht ein fettreicher, nekrotischer Kern (Sergin, Evans, and Razani 2015). Fortgeschrittene Plaques enthalten zudem Cholesterol-Kristalle und Mikrogefäße (Abb. 8A). Durch eine länger andauernde Entzündung kann es zu einer Instabilität der fibrotischen Kappe und zum Bruch der Plaques kommen. Die dabei freiwerdende thrombogene Region initiiert die Gerinnungskaskade, die Thrombozytenaggregation und die Thrombose (Abb. 8B) (Libby, Ridker, and Hansson 2011; Linton et al. 2000; Glass and Witztum 2001).

Zu den Genen, die die Entstehung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen beeinflussen, zählen beispielsweise die Oxidase NO-Synthase (NOS), Zell-Adhäsionsmoleküle wie P- und E-Selektin, die Chemotaxis von Makrophagen fördernde

Moleküle wie MCP-1 (Monocyte chemotactic protein), für die Cholesterol-Homöostase in Makrophagen verantwortliche Moleküle wie ABC-Transporter (ABC-A1) und die Plaque-Stabilität beeinflussende Moleküle wie Matrix-Metalloproteinasen (Glass and Witztum 2001).

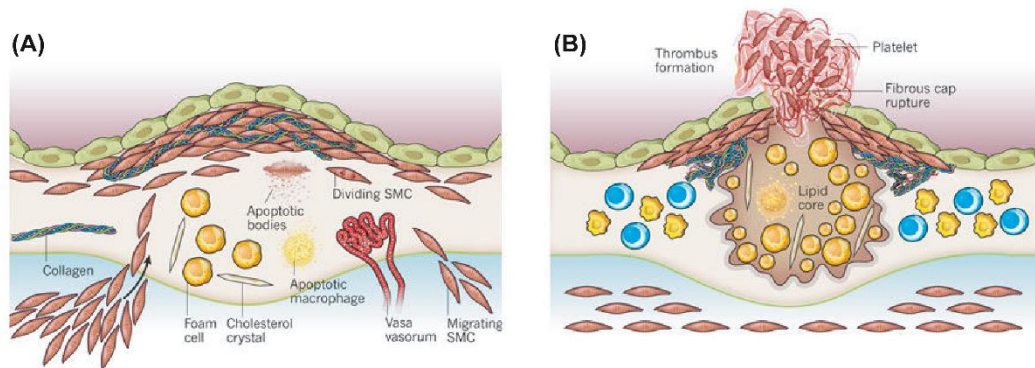


Abb. 8 Die Bildung von fortgeschrittenen, atherosklerotischen Plaques (aus (Libby, Ridker, and Hansson 2011))

(A) Bildung einer fibrotischen Kappe und eines fettreichen, nekrotischen Kerns. (B) Thrombose

Die Bedeutung endolysosomaler Organellen für die Cholesterol-Homöostase wird auch durch die Atherosklerose-Anfälligkeit von Maus-Modellen und Patienten, denen NPC1 oder LAL fehlen, deutlich.

Morbus Niemann-Pick Typ C1 ist eine autosomal rezessive Erkrankung, bei der ein Trafficking-Defekt im ganzen Körper zu einer Akkumulation von Lipiden in späten Endosomen und Lysosomen führt. NPC1-/-ApoE-/- Doppelknockout-Mäuse zeigen neben einer Dyslipidämie und einer größeren Plaquefläche auch verstärkt Plaque-Komplikationen wie eine Atherothrombose und eine Degradierung der Media (Welch et al. 2007).

Ein Mangel an lysosomaler, saurer Lipase hat eine massive Anhäufung von Cholesterinestern und Triglyceriden zur Folge. In Menschen äußert sich die komplette Abwesenheit der LAL in der Wolman Krankheit, die meist schon vor dem 1. Lebensjahr tödlich verläuft. Individuen mit einer minimalen LAL Aktivität (Cholesterolester-Speicherkrankheit, CSED) überleben meist bis ins frühe Erwachsenenalter. Diese Patienten haben eine Fettleber und eine vergrößerte Milz, entwickeln eine Dyslipidämie und meist verfrüht eine atherosklerotische Gefäßerkrankung (Dubland and Francis 2015). In genomweiten Assoziationsstudien wurde zudem ein Zusammenhang zwischen einer codierenden Variante des LIPA-Gens, das für die lysosomale, saure Lipase codiert, und einem erhöhten Risiko für eine koronare Herzkrankheit aufgrund eines verstärkten LAL-Abbaus gefunden (Morris et al. 2017). Interessanterweise reduziert bei LAL-/- Mäusen die exogene Gabe von LAL die pathogene Speicherung von

Lipiden in viele Geweben und die Entwicklung einer Atherosklerose (Du et al. 2004; Du et al. 2002).

Dies unterstützt die Auffassung, dass für die Lipid-Aufnahme und Verarbeitung durch Makrophagen eine intakte lysosomale Degenerations- und Fusions-Maschinerie benötigt wird. Eine Dysfunktion in diesem Prozess, wie sie bei der Niemann Pick Typ C Erkrankung und CESD der Fall ist, führt zu einer lysosomalen Lipid-Akkumulation, zu einer reduzierten ApoA1 Expression, zu geringen Mengen an HDL und trägt damit zur Progression der Atherosklerose bei (Sergin, Evans, and Razani 2015; Dubland and Francis 2015).

Auch der endolysosomale TPC2 beeinflusst die Cholesterol-Homöostase. Aufgrund von Trafficking-Defekten zeigten TPC2-defiziente MEF-Zellen und Hepatozyten eine konzentrationsabhängige Cholesterol-Akkumulation. Bei TPC2^{-/-} Mäusen, die mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert wurden, konnte eine nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD) und ein Anstieg der Plasma- und Leber- Gesamtcholesterolumengen beobachtet werden (Grimm et al. 2014). Zudem entwickelten TPC1^{-/-}TPC2^{-/-} Doppelknockout-Mäuse eine Adipositas im späteren Lebensalter (Lear et al. 2015). Zum Einfluss des TPC2 auf die Entstehung einer Atherosklerose war bisher noch nichts bekannt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des TPC2 auf Pigmentierungsprozesse und die Entstehung einer Atherosklerose zu untersuchen, um ein besseres Verständnis für die physiologische Funktion des Ionenkanals zur erlangen.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass der TPC2 eine Rolle bei der Melanin-Produktion in Melanozyten und den Oozyten des Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, spielt (Bellono, Escobar, and Oancea 2016; Ambrosio et al. 2016; Lin-Moshier et al. 2014). Zudem wurden in einer genomweiten Assoziationsstudie von (Sulem et al. 2008) zwei Polymorphismen des hTPC2 entdeckt (M484L und G734E) (Abb.2A), die eine Korrelation mit blonder Haarfarbe zeigten. Daher war es das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit, Mechanismen aufzuzeigen, die die Assoziation zwischen dem TPCN2-Gen und diesem Phänotypen erklären können.

Auch wurde in früheren Publikationen gezeigt, dass der TPC2 für endolysosomale Traffickingprozesse und die Lipid-Homöostase von Bedeutung ist. Das Fehlen des TPC2 äußert sich in MEF-Zellen in einer Cholesterol-Akkumulation, in Mäusen in einer Hypercholesterinämie, einer nicht-alkoholischen Fettleber (NAFLD) und einer Adipositas (Grimm et al. 2014; Lear et al. 2015). Daher war es Ziel des zweiten Teils der Arbeit die pathophysiologischen Auswirkungen eines Verlusts des TPC2 auf atherosklerotische Veränderungen von Blutgefäßen zu untersuchen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Chemikalien hatten die Qualität *pro analysi* oder *für molekularbiologische Anwendung*. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde hochreines, entionisiertes Wasser (H₂O) aus dem Milli-Q Plus System (Millipore) verwendet. Puffer oder Lösungen für hochsensitive Anwendungen wurden steril filtriert oder autoklaviert (Sterilisator, Münchner Medizin Mechanik).

3.2 Verwendete Mauslinien und Futter

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete TPC2^{-/-} Maus wurde von der Arbeitsgruppe generiert. Zur Deletion wurde das Exon 7 des TPCN2-Gens gewählt, das für die Transmembrandomäne S5 und für einen Teil der ersten P-Schleufe kodiert. Bei der ApoE^{-/-} Mauslinie von Charles River wurde ein Teil des Exons 3 und des Introns 3 des ApoE-Gens deletiert. Das Apolipoprotein E ist ein Bestandteil aller Lipoproteine außer LDL. Es fungiert als Ligand für die Rezeptor-vermittelte (v.a. LDLR) Clearance der Reste von Chylomikronen und VLDL-Partikel (Zhang et al. 1992; Linton et al. 2000; Pendse et al. 2009). ApoE^{-/-} Mäuse entwickeln spontan Gefäßläsionen, auch bei Fütterung mit einer normalen, fett- und cholesterolarmen Standarddiät (Meir and Leitersdorf 2004; Plump et al. 1992). TPC2^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäuse wurden gekreuzt, um TPC2^{-/-}-ApoE^{-/-} Doppelknockout-Mäuse zu generieren. Für den Vergleich von ApoE^{-/-} mit TPC2^{-/-}-ApoE^{-/-} Mäusen wurden die Tiere 34 Wochen lang mit einer normalen Standarddiät (Ssniff; regular feed: R/ M) gefüttert. Es wurden männliche Mäuse aus homozygoten Zuchten verwendet.

Um bei Wildtyp (WT)- und TPC2^{-/-} Mäusen eine Hypercholesterinämie zu induzieren, wurden die Mäuse im Alter von 8 Wochen für einen Zeitraum von 6 Wochen auf eine Hoch-Fett-Diät von Ssniff gesetzt. Diese enthielt 21% Fett und 0,15% Cholesterol (die Zusammensetzung entsprach der Harlan Teklad TD88137 Diät). Bei den hier verwendeten Versuchstieren handelte es sich um männliche Tiere aus heterozygoten Zuchten (Geschwister eines Wurfes). Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libidum* und wurden in einem 12 Stunden Tag-/ Nacht- Rhythmus gehalten.

3.3 Arbeiten mit DNA

3.3.1 Isolation von menschlicher, genomischer DNA

Die Isolation humaner genomischer DNA von erwachsenen Frauen und Männern erfolgte mit dem Gentra Buccal Cell Kit (Quiagen) nach Anweisung des Herstellers. Die Verwendung von Zytobürsten ermöglichte das Abschaben von Zellen der Wangenschleimhaut. Für die Zelllyse wurde der Bürstenkopf in einem Lysepuffer für mindestens 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine gefällt und abzentrifugiert. Um die DNA zu präzipitieren, wurde der Überstand mit Isopropanol und Glycogen-Lösung versetzt. Das Pellet wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet, bevor es in DNA-Hydrationslösung resuspendiert wurde. Nach einer Inkubation bei 65 °C für eine Stunde wurden die Proben bei Raumtemperatur über Nacht gelagert, um das vollständige Lösen der DNA zu gewährleisten.

3.3.2 Isolation von genomischer DNA aus tierischem Gewebe

Um die DNA zu extrahieren wurde die Gewebeprobe mit 50 mM NaOH für 10 Minuten bei 98°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 M TrisHCl pH=8 konnten die Gewebereste abzentrifugiert werden.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde verwendet, um Gene zu amplifizieren, Mutationen zu korrigieren oder zu entfernen und für Genotypisierungen. Das Protokoll wurde für die jeweilige Anwendung angepasst. Die folgende Tabelle zeigt Standard PCR Bedingungen der Polymerasen, die in dieser Studie verwendet wurden (GoTaq-Polymerase nur für Maus-Genotypisierungen).

| Polymerase | Q5 (NEB) | Kapa Hifi (Peqlab) | GoTaq (Promega) | |
|-------------------------------|---------------|--------------------|-----------------|-----|
| Initiale Denaturierung | 98 °C, 30 sec | 95 °C, 2 min | 94 °C, 2 min | |
| Denaturierung | 98 °C, 10 sec | 98 °C, 20 sec | 94 °C, 30 sec | |
| Primer-Bindung (Annealing) | X °C, 20 sec | X °C, 20 sec | X °C, 30 sec | 35x |
| DNA-Synthese (Elongation) | 72 °C, 1 min | 72 °C, 2 min | 72 °C, 2 min | |
| Finale Elongation | 72 °C, 2 min | 72 °C, 5 min | 72 °C, 5 min | |
| Lagerung | 21 °C ∞ | 21 °C ∞ | 21 °C ∞ | |

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

| | Q5 (NEB) | Kapa Hifi (Peqlab) | GoTaq (Promega) |
|-----------------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------|
| DNA | 25 ng für gDNA 1 ng Plasmid DNA | 1 ng | 2- 4 µl |
| Puffer | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 µl | 0,75 µl | 0,5 µl |
| Vorwärts Primer (10 µM) | 1,25 µl | 0,75 µl | 2 µl |
| Rückwärts Primer (10 µM) | 1,25 µl | 0,75 µl | 2 µl |
| Polymerase | 0,25 µl | 0,5 µl | 0,125 |
| H ₂ O | ad 25 µl | ad 25 µl | ad 25 µl |

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um PCR-Produkte aufzutrennen und aufzureinigen oder um ein Bandenmuster nach dem Verdau zu visualisieren, wurden die Proben abhängig von der Länge des DNA-Fragments auf ein 0,7– 2 %iges Agarosegel geladen. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge an 6x Ladepuffer versetzt, um die Lauffront zu markieren. Proben- und Leiter-DNA (GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific) wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, dem der Farbstoff PeqGreen (Peqlab) zugesetzt wurde. Die Elektrophorese erfolgte mit TBE-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung. Die DNA zeigte sich als fluoreszierende Bande im UV-Licht. Der Vergleich mit der Leiter-DNA ermöglichte die Größenbestimmung der Proben-DNA.

10x TBE

| | |
|-------------------|--------|
| 0.5 M EDTA pH 8.0 | 200 ml |
| Borsäure | 275 g |
| Tris | 540 g |
| H ₂ O | ad 5 l |

6x Ladepuffer

| | |
|--------------------------|-----------|
| 0.5 M EDTA pH 8.0 | 24 ml |
| 10x TBE | 60 ml |
| Xylencyanol 50 mg/ ml | 3 ml |
| Bromphenolblau 50 mg/ ml | 3 ml |
| Ficoll Typ 400 | 18 g |
| H ₂ O | ad 100 ml |

3.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) nach Anweisung des Herstellers. Zur PCR-Probe oder zum Gel-Stück wurde die dreifache Volumenmenge QG-Puffer gegeben. Das Gel-Stück musste sich darin komplett lösen. Nach Zugabe von Isopropanol wurde die Probe auf eine QIAquick-Säule geladen und für eine Minute zentrifugiert. Somit wurde die DNA an die Silica-Membran gebunden. Um die DNA zu waschen, wurde PE-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit Elutions-Puffer durch Zentrifugation von der Säule in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß eluiert.

3.3.6 Plasmide

Das pcDNA3-Plasmid ist ein Vektor, der für die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen konzipiert und aus folgenden Modulen aufgebaut ist:

- Ein Cytomegalievirus (CMV) Enhancer-Promotor, der eine heterologe Expression auf hohem Niveau in Säugetierzellen ermöglicht.
- Eine multiple Klonierungsstelle (MCS), die mehrere Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme enthält und es ermöglicht ein relevantes DNA-Fragment zu integrieren.
- Ein Ampicillin-Resistenzgen, das die Selektion von Bakterienzellen, die das Plasmid ins Zellinnere aufgenommen haben, ermöglicht. Dieses Gen codiert für eine β -Lactamase, die Penicillin-Antibiotika abbaut.
- Ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors, das die Selektion von stabilen Säugetierzellen ermöglicht.
- Ein viraler Replikationsstart SV40 ori, durch den die Vermehrung des Plasmids in Säugetierzellen initiiert wird.
- Einem Replikationsstart ColE1 ori, durch den die Replikation in Prokaryoten initiiert wird.
- Ein Replikationsstart F1 ori, der die Wiederherstellung von Einzelstrang-Plasmiden in Prokaryoten ermöglicht.
- Eine Polyadenylierungsstelle aus dem bovinen Wachstumshormon (BGH), die eine effiziente Beendigung der Transkription gewährleistet.

3.3.7 Präparation von DNA-Fragmenten für das Klonieren und die Restriktionsanalyse

Es wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB) oder Thermo Fisher Scientific verwendet. Enzymmengen und Puffer, sowie Reaktionstemperatur und Inkubationsdauer wurden nach Angaben des Herstellers gewählt.

Für Klonierungen wurden 4- 5 μ g des Vektors bzw. PCR-Produkts mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen, wurde ein Kontroll-Verdau mit 1 μ g der Minipräparation oder der Plasmid-DNA durchgeführt. Dies ermöglichte die Analyse des Bandenmusters der Restriktionsfragmente.

3.3.8 Dephosphorylierung und Ligation

Um die Selbstligation des Vektors zu verringern, wurde die Vektor-DNA mit dem Rapid DNA Dephosphorylation Kit (Roche) nach Anweisung des Herstellers behandelt. Das Enzym alkalische Phosphatase entfernt dabei die Phosphatgruppen am 5' Ende der DNA-Moleküle. Die Ligation wurde mit der T4 DNA Ligase (NEB) durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Ligationsansatzes:

| | |
|---------------------------------|----------|
| Vektor | X µg |
| DNA-Fragment | Y µg |
| T4-DNA Ligase Puffer, 10x (NEB) | 2 µl |
| T4-DNA Ligase (NEB) | 1 µl |
| H ₂ O | ad 20 µl |

Das Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment wurde für jede Ligation abhängig von der auf dem Agarose Check-Gel nach der DNA-Aufreinigung beobachteten DNA-Menge bestimmt (1:3 – 1:10). Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

3.3.9 Transformation bakterieller Zellen

3- 5 µl des Ligationsansatzes oder 10 ng isolierter Plasmid-DNA wurden mit 100 µl frisch aufgetauten, chemisch kompetenten β 10 Escherichia coli Zellen gemischt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Dem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C folgte eine zweiminütige Inkubation der Zellen auf Eis. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Ampicillin als Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

| | |
|------------------|---------|
| LB (+) Medium | |
| Pepton | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| Glukose | 1 g |
| H ₂ O | ad 11 l |

Den pH-Werts auf 7,2– 7,5 einstellen und autoklavieren.

LB (+) Agar

| | |
|---------------|--------|
| Agar | 15 g |
| LB (+) Medium | ad 1 l |
| Ampicillin | 100 mg |

3.3.10 Isolation der Plasmid-DNA

Zunächst war es erforderlich festzustellen, welche Klone ein rekombinantes Plasmid mit dem eingefügten Zielfragment enthalten. Dazu wurden Einzelkolonien aus einer Transformationsplatte in 5 ml Kulturmedium, das das Antibiotikum enthielt (Ampicillin 100 µg/µl), übertragen, damit sie über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (225 rpm) bis zur stationären Phase wachsen konnten. Die Plasmide wurden dann aus den Kulturen mithilfe der Minipräp-Technik isoliert. 2 ml der Zellsuspension wurden zentrifugiert (3500 rpm, RT, 10 Minuten) und der Überstand entfernt. Die hier angewandte Methode zur Trennung der Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und anderen Zellbestandteilen ist die Alkalische Lyse.

Dafür wurde das erhaltene Pellet in 250 µl eiskaltem Resuspensions-Puffer resuspendiert. Nachdem Lyse-Puffer zugegeben wurde, wurde die Suspension invertiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Präparation mit einer Kaliumacetatlösung bei pH= 5 neutralisiert und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Dies bewirkte die Präzipitation der denaturierten Proteine zusammen mit der chromosomalen DNA und den Zellmembranresten. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (12000 rpm, 4 °C, 5 Minuten) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Um die Plasmid-DNA zu fällen, wurden 525 µl 100 %iger Isopropanol zum Lysat zugegeben. Die Mischung wurde invertiert und zentrifugiert (max. rpm, 4 °C, 15 Minuten). Dem Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol (EtOH) folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (max. rpm, 4 °C, 5 Minuten). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und die DNA in 25 µl H₂O gelöst.

Für die Isolation größerer Mengen reinerer Plasmid-DNA wurden das PureLink HiPure Plasmid Midiprep oder das Megaprep Kit (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers verwendet.

Resuspensions-Puffer

| | |
|------------------|--------|
| Tris | 6,06 g |
| EDTA | 3,72 g |
| RNAse A | 100 mg |
| H ₂ O | ad 1 l |

Mit 37 %iger HCl auf pH= 8,0 einstellen.

Lyse-Puffer

| | |
|--------------------|--------|
| NaOH | 8 g |
| 10 %ige SDS Lösung | 100 ml |
| H ₂ O | ad 1 l |

Neutralisations-Puffer

| | |
|--------------------------|--------|
| 3 M Kaliumacetat pH= 5,5 | 500 ml |
| H ₂ O | ad 1 l |

3.3.11 DNA Quantifizierung und Sequenzierung

Um die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde am Nanodrop 2000c Spektrophotometer die Absorption bei 260 nm gemessen. Der Quotient von 260nm/ 280nm gibt die Reinheit der DNA-Präparation an und sollte mindestens bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf die Anwesenheit von Proteinen oder anderen Verunreinigungen hin.

Um den Klonierungserfolg zu verifizieren, wurde durch Sequenzierung die Nukleotidabfolge bestimmt und auf Veränderungen geprüft (Punktmutation, Deletion, Insertion). Alle Sequenzierungen wurde von Eurofins MWG durchgeführt.

3.3.12 Einführung und Entfernung von Mutationen in DNA-Konstrukte

Mutationen wurden in die DNA-Sequenz mit der Overlap Extension PCR Methode eingeführt. Dazu wurden zwei innere (die Mutation enthaltende) Primer und zwei äußere Primer benötigt. Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen zwei Fragmente amplifiziert, deren überlappender Sequenzbereich die gewünschte Mutation enthielt. Diese Fragmente wurden

als Template-DNA für eine weitere PCR verwendet, in der das komplette PCR-Produkt mithilfe der äußeren Primer amplifiziert wurde.

3.3.13 Verwendete Konstrukte: hTPC2 und hmTOR

Alle humanen TPC2-Varianten wurden aus dem Plasmid hTPC2-M484L/G734E-mCherry, einem Geschenk von Prof. Dr. Michael Zhu (Universität Texas, Health Science Center, Houston), generiert und in einen pcDNA3.1 Vektor subkloniert. Die Punktmutationen wurden durch Overlap Extension PCR entfernt. Für die Lebendzell-, Coimmunopräzipitations-, Membranpräparations- und Elektrophysiologie-Experimente waren die TPC2-Varianten C-terminal mit gelb fluoreszierendem Protein (YFP) markiert. Für FRET-Experimente mit mTOR als Partner wurden N-terminal mit Cerulean markierte hTPC2-Varianten verwendet. Da TPCs Dimere in einer N- zu C-terminalen Symmetrie formen (Rietdorf et al. 2011), wurden für diese Messungen entsprechende Konstrukte verwendet: Eines hatte das FRET-Donor-Molekül am N-terminus (hTPC2-YFP) und das andere das FRET-Akzeptor-Molekül am C-terminus (Cer-hTPC2) angehängt.

pcDNA3-Flag-mTOR wurde von addgene zur Verfügung gestellt und für die Coimmunopräzipitations-Experimente verwendet. Für FRET-Experimente wurde N-terminal mit Citrine und für Lebendzell-Experimente C-terminal mit Cyan fluoreszierendem Protein (CFP) markiertes mTOR verwendet. Alle Konstrukte wurden unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert.

3.4 Zellkultur

Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter der Sterilbank (HERAsafe HS18, Heraeus) durchgeführt.

3.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, wenn sie etwa 80 % Konfluenz erreicht hatten. Hierfür wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde eine 0,05 %ige Trypsin/ EDTA Lösung (Life Technologies) zugegeben und für 1- 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die adhärenenten Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst hatten, wurden sie in frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert und in der gewünschten Menge in neue Zellkulturschalen oder -flaschen (Greiner Bio-one) gegeben.

PBS pH= 7,4

| | |
|--|--------|
| NaCl | 4 g |
| KCl | 1 g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 14,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,2 g |
| H ₂ O | ad 5 l |

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden in einem DMEM + GlutaMAX_{TM}-I Medium (+1 g/ l Glucose, + Pyruvat, Life technologies), das mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin versetzt wurde, bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert.

Fibroblasten wurden in einem glucosereichen DMEM Medium (+4,5 g/ l Glucose, +L Glutamin, +Pyruvat, Life technologies) ohne irgendwelche Zusätze bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für Experimente wurden nur die Passagen 3- 7 verwendet.

3.4.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen wurden für FRET-Experimente auf Glasbodenschale mit einem Durchmesser von 35 mm (IBL), für die Lebendzell-Mikroskopie in 6-Loch-Vertiefungsplatten (Greiner Bio-One) und für Coimmunopräzipitations- und Membranpräparations- Experimente in Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm (Greiner Bio-One) ausgesät.

Als Transfektionsreagenz wurde das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI, Polyscience) nach Anweisung des Herstellers verwendet. PEI bildet mit den negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe, die sich an die Zellmembran anlagern und per Endozytose ins Zellinnere geschleust werden.

| | Menge |
|--|---|
| Plasmid DNA | 10 µg DNA (10 cm Platten) 1- 3 µg DNA (35 mm Glasbodenschale, 6-Lochvertiefungsplatte) |
| Serum-freies DMEM + GlutaMAX _{TM} -I Medium | 10 % des Endvolumens im Kulturgefäß |
| PEI (1 µg/ µl) | Verhältnis 1: 1 PEI (µg): DNA (µg) |

Die DNA wurde in 37 °C warmem, Serum-freiem DMEM + GlutaMAX^{TM-1} Medium verdünnt. Nach der Zugabe von PEI wurde der Ansatz gevortext, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, tropfenweise auf die Zellen gegeben und gemischt. Nachdem die Zellen 6 bis 8 Stunden mit der Transfektionslösung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert worden waren, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit frischem Medium versetzt und bei 37 °C und 10 % CO₂ weiter kultiviert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und für nachfolgende Experimente verwendet.

3.5 Lebendzell-Mikroskopie

Für die Lebendzell-Experimente wurden Zellen 2 Tage nach der Transfektion mit den C-terminal mit YFP markierten Varianten des hTPC2 verwendet. Für die Co-Expressions-Experimente wurde zusätzlich mTOR-CFP transfiziert. Die Behandlung mit 1 µM Vacuolin-1 erfolgte über einen Zeitraum von 4 Stunden, die Behandlungsdauer mit 25 nM Lysotracker® Deep Red (Life technologies) betrug 30 Minuten. Vacuolin-1 kann endolysosomale Vesikel von weniger als 0,5 µm auf einen Durchmesser von bis zu 5 µm anschwellen lassen (Dong et al. 2010). Lysotracker® ist ein tiefroter, fluoreszierender Farbstoff, der mit einer schwachen Base verknüpft ist, und sich daher in sauren Zellorganellen anreichert.

3.5.1 Konfokalmikroskopie

Die Zellen wurden mit dem Zeiss LSM 510 Meta Konfokalmikroskop untersucht. Konfokale Mikroskope können im Scanverfahren dreidimensionale Aufnahmen erzeugen und den Streulichtanteil von Bereichen außerhalb der Brennebene unterdrücken (Engelhardt and Knebel 1993). Das Zeiss LSM 510 Meta Konfokalmikroskop ist mit 4 Lasern ausgestattet: UV (251nm), Argon2 (488 nm), HeNe/ 1 (543 nm), HeNe/ 2 (633 nm). Mit dem Laser können nacheinander in verschiedenen Kanälen die verschiedenen Fluorophore angeregt werden. Bei der Auswahl der Fluorophore muss darauf geachtet werden, dass sich die abgestrahlten Farbspektren möglichst stark voneinander unterscheiden.

| Fluoreszierendes Protein/ Farbstoff | Farbe | Exzitation [nm] | Emission [nm] |
|--|-------|-----------------|---------------|
| CFP | blau | 405 | 485 |
| YFP | gelb | 514 | 527 |
| Lysotracker® DR | rot | 647 | 668 |

Die Aufnahmen erfolgten mit Ölimmersionsobjektiven in 63-facher Vergrößerung.

3.5.2 Der Korrelationskoeffizient nach Pearson

Um die Kolokalisation zu analysieren, wurde mit dem ImageJ Plugin „Colocalization Finder“ der Korrelationskoeffizient nach Pearson (PCC) ermittelt. Dieser Koeffizient gibt den Grad der linearen Beziehung zweier Verteilungen wieder (z.B. der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten zweier Bilder). Er kann Werte zwischen 1 und -1 annehmen, wobei ein Quotient von 1 eine völlige Kolokalisation, ein Quotient von 0 keine Kolokalisation bedeutet. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel (Manders *et al.*, 1992):

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

Hierbei repräsentieren R und G die Intensitäten von Bildpunkten und \bar{R} und \bar{G} die arithmetischen Mittelwerte aller Intensitätswerte eines Bildes.

3.6 Arbeiten mit Proteinen

3.6.1 Isolation und Quantifizierung von Proteinen

Um Proteine aus transfizierten HEK293-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm wurde der Überstand entfernt. Das Zell-Pellet wurde in eiskaltem RIPA-Puffer, dem eine entsprechende Menge Proteinase-Inhibitor (Roche) zugesetzt wurde, resuspendiert und 30 Minuten lang bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13200 rpm, 4 °C, 10 Min.) wurde der Überstand in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

RIPA-Puffer

| | |
|---------------------|----------|
| NaCl 5M | 600 µl |
| 10 % Triton-X-100 | 1 ml |
| 10 % Na-Deoxycholat | 1 ml |
| 10 %ige SDS-Lösung | 200 µl |
| 1 M Tris, pH= 8 | 1 ml |
| H ₂ O | ad 20 ml |

Der Gesamt-Proteingehalt der Probe wurde mit der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Zu 5 µl Protein-Lysat wurden 95 µl 0,15 M NaCl zugegeben und in 1 ml Poly(methylmetacrylate)-Küvetten überführt. RIPA-Puffer diente als Negativ-Kontrolle. Nach der Zugabe von 1 ml Coomassie-Brillant-Blau-Lösung wurden die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Bindung des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau an Proteine kommt es zu einem Farbumschlag von blass-bräunlich zu blau. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Proteinmenge in der Probe. Die photometrische Bestimmung erfolgte unter Verwendung des BioPhotometers (Eppendorf) bei 535 nm. Die Konzentration wurde anhand einer Eichgerade ermittelt.

Coomassie-Brillant-Blau-Lösung

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Coomassie-Brillant-Blau | 2,5 ml |
| 95 % EtOH | 25 ml |
| 85 % H ₃ PO ₄ | 50 ml |

3.6.2 Endolysosomale Membranpräparationen

Um die Expressionslevel der hTPC2-Varianten zu beurteilen, wurden Lysosomen aus HEK293-Zellen, die transient mit den hTPC2-Varianten transfiziert worden waren, nach dem Protokoll von (Schieder et al. 2010a) isoliert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Homogenisierungspuffer versetzt, dem die entsprechende Menge Proteinase-Inhibitor (Roche) zugesetzt wurde, und mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst. Um Zell-Lysate zu erhalten, wurden die Zellen auf Eis mit einem Potter Homogenisator (Potter S, B. Braun) zerkleinert (12 x, 900 rpm). Anschließend wurde das Homogenat in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in ein 10 ml Polycarbonat-Gefäß (Beckman, #355630) wurde die gleiche Menge 16 mM CaCl₂ zugegeben (normalerweise 1,6 ml) und die Proben bei 150

rpm und 4 °C für 5 Minuten geschüttelt. Die darauffolgende, fünfminütige Ultrazentrifugation wurde bei 18000 rpm und 4 °C in einer Sorvall discovery 90 Ultrazentrifuge mit einem 45 Ti Rotor (Beckman) durchgeführt. Dann wurde das Pellet in 20 µl eiskaltem Waschpuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration wie im Kapitel 3.6.1 beschrieben bestimmt.

Homogenisierungs-Puffer

| | |
|------------------|-----------------|
| Sucrose | 8,56 g (250 mM) |
| Tris-HCl | 0,16 g (10 mM) |
| H ₂ O | ad 100 g |

Mit NaOH auf pH= 7,4 einstellen.

CaCl₂-Lösung

| | |
|--|----------|
| CaCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,235 g |
| H ₂ O | ad 100 g |

Wasch-Puffer

| | |
|------------------|-----------------|
| KCl | 1,15 g (150 mM) |
| Tris-HCl | 0,16 g (10 mM) |
| H ₂ O | ad 100 g |

Mit NaOH auf pH= 7,4 einstellen.

3.6.3 De-Glycosylierung

Da Glycoproteine oft als Schmier im Westernblot erscheinen, wurde ein zusätzlicher De-Glycosylierungs-Schritt mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF, NEB) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Glycoproteine (in Glycoprotein-Denaturierungspuffer) durch Erhitzen bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Enzym PNGase F bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, um spezifisch glykosidische Bindungen von N-Acetylglucosamin an Asparagin abzuspalten. Nach Zugabe von 6x Lämmli wurden die Proben bei 70 °C für 10 Minuten erhitzt und via SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiter analysiert.

6x Lämmli

| | |
|-------------------|----------|
| Tris-HCl, pH= 6,8 | 7 ml |
| Glycerol | 3 ml |
| SDS | 1 g |
| Bromphenolblau | 1,2 mg |
| H ₂ O | ad 10 ml |

6x Lämmli + DTT

| | |
|-----------|--------|
| 6x Lämmli | 10 ml |
| DTT | 930 mg |

3.6.4 Coimmunopräzipitation (Co-IP)

Um Protein-Protein-Interaktionen zu bestimmen, wurden Coimmunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurden die Zell-Lysate mit Protein A Dynabeads (Life Technologies) vorinkubiert (4 °C, 10 Minuten). Letztere wurden durch Zentrifugation wieder entfernt. 10 % des Überstandes wurde als Input-Kontrolle, der Rest für eine Coimmunopräzipitation verwendet. Dazu wurden 6 µg anti-GFP Antikörper (JL-8, Clontech) je Probe zugegeben, mit PBS auf 500 µl aufgefüllt und bei 4 °C für 2 Stunden unter Rotation inkubiert. Nach Zugabe der Protein A Dynabeads wurden die Proben weitere 2 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, wobei die Beads mit einem Magneten zurückgehalten wurden. Zum Schluss wurden die Proteine vom Beads-Antikörper-Komplex eluiert, indem sie in 13,5 µl PBS und 6x Lämmli-Puffer mit Dithiothreitol (DTT) resuspendiert und für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt wurden. Nachdem die Beads mit dem Magneten entfernt wurden, konnten die Lösungen via SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiter analysiert werden.

3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurde nach Lämmli durchgeführt (Lämmli, 1970). Dazu wurde ein Polyacrylamid-Gradientengel, bestehend aus einem Sammelgel und einem 6-12 %igen Trenngel, mit dem Mini Protean 3 Gel System (BioRad) hergestellt. Die Konzentration an Acrylamid und der Vernetzungsgrad bestimmen

die Porengröße. Die Polymersation erfolgte unter Zusatz des Katalysators Tetramethylethyldiamin (TMED) und des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS). Die Protein-Lysate wurden vor der Elektrophorese mit 6x Lämmli erhitzt. Das enthaltene Natriumdodecylsulfat zerstört die nicht-kovalenten Bindungen nativer Proteine. Es entstehen weitgehend lineare Polypeptidketten, die mit Dodecylsulfat bedeckt sind und im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Zum Vergleich wurde neben den Proben ein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt.

10x Elektrophorese-Puffer

| | |
|------------------|--------|
| Tris | 30 g |
| Glycin | 144 g |
| SDS | 10 g |
| H ₂ O | ad 1 l |

4x Tris-HCl/ SDS Puffer pH= 6,8

| | |
|------------------|----------|
| Tris-Base | 3,02 g |
| SDS | 0,2 g |
| H ₂ O | ad 50 ml |

Mit HCl auf pH= 6,8 einstellen.

4x Tris-HCl/ SDS Puffer pH= 8,8

| | |
|------------------|-----------|
| Tris-Base | 18,2 g |
| SDS | 0,4 g |
| H ₂ O | ad 100 ml |

Mit HCl auf pH= 8,8 einstellen.

Sammelgel (Ansatz für 2 Gele)

| | |
|------------------------------------|----------|
| 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid | 1,45 ml |
| Tris-HCl / SDS Puffer pH 6,8 | 2,8 ml |
| H ₂ O | 6,85 ml |
| APS | 56,25 µl |
| TMED | 11,25 µl |

| Trenngel (Ansatz für 2 Gele) | 6 % | 12 % |
|---------------------------------------|---------|---------|
| 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid | 2,3 ml | 4,5 ml |
| Tris-HCl/ SDS Puffer pH 8,8 | 2,8 ml | 2,8 ml |
| H ₂ O | 6,2 ml | 3,9 ml |
| APS | 22,5 µl | 22,5 µl |
| TMED | 7,5 µl | 7,5 µl |

3.6.6 Westernblot

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine mittels Westernblot nachgewiesen. Dazu wurde das SDS-Gel auf eine Methanol- (MeOH) getränkte PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) gelegt und luftblasenfrei zwischen jeweils zwei Transferpuffer-getränkte Filterpapiere (Whatman-Papier) gebettet.

Der Transfer erfolgte in einer Mini Trans-Blot Apparatur (BioRad) bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA (ca. 1 Stunde). Um freie Bindungsstellen abzusättigen und unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu vermeiden, wurde die Membran anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blockierlösung inkubiert. Die zu untersuchenden Proteine wurden mittels spezifisch gegen die jeweiligen Proteine gerichteten Primär-Antikörpern detektiert. Dazu erfolgte eine Inkubation der Membran mit der entsprechenden Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran drei Mal für 5 Minuten mit TBST gespült. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation in einer Sekundärantikörper-Lösung. Es wurden Sekundärantikörper verwendet, die gegen Immunglobuline der Tierspezies, aus der die Erstantikörper gewonnen wurden, gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren. Nach drei weiteren Waschschritten in 1x TBST

erfolgte die Detektion der Proteine mit dem Luminol Reagenz (Santa Cruz). Bei der Oxidation des Luminols durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase kommt es zur Emission von Licht. Die Chemilumineszenz wurde unter Verwendung des Chemidoc MP Imaging Systems (BioRad) und der ImageLab Software detektiert.

Transferpuffer

| | |
|------------------|--------|
| Tris-Base | 3,03 g |
| Glycin | 14,4 g |
| MeOH | 200 ml |
| H ₂ O | ad 1 l |

10x TBS

| | |
|------------------|-----------------|
| Tris-Base | 12,1 g (100 mM) |
| NaCl | 80,23 g (1,4 M) |
| H ₂ O | ad 1 l |

TBST

| | |
|------------------|--------|
| 10x TBS | 100 ml |
| Tween 20 | 1 ml |
| H ₂ O | ad 1 l |

Unter Lichtschutz aufbewahren.

Blockierlösung

| | |
|-------------|-------|
| TBST | 30 ml |
| Milchpulver | 1,5 g |

Antikörper-Lösung

| | |
|-------------|--------|
| TBST | 5 ml |
| Milchpulver | 0,05 g |
| Antikörper | X |

X: Verdünnung der Antikörper: siehe Anhang

3.7 Förster-Energie-Resonanz-Transfer (FRET)

Die Förster-Energie-Resonanz-Transfer (FRET)- Messungen wurden nach dem Protokoll von (Butz et al. 2016) durchgeführt. FRET ist eine Methode, die eine Quantifizierung relativer Bindungs-Affinitäten von Protein-Protein Interaktionen ermöglicht. Das Phänomen kann zwischen zwei Fluorophoren beobachtet werden. Nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge gibt ein Donor-Farbstoff normalerweise seine Energie in Form eines Photons ab, wodurch fluoreszierende Strahlung entsteht. Wenn sich jedoch in seiner Nähe ein Akzeptor-Farbstoff befindet, überträgt der Donor-Farbstoff seine Energie strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf diesen zweiten Fluorophor. Das resultiert in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors und der Emission von Licht durch das angeregte Akzeptor-Molekül.

Voraussetzungen für das Zustandekommen von FRET ist zum einen eine räumliche Nähe der FRET-Partner ($R < 100 \text{ \AA} / 10 \text{ nm}$) und zum anderen ein Überlappen des Emissionsspektrums des Donors mit dem Exzitationsspektrum des Akzeptors (Abb. 9A). Die FRET-Effizienz ist abhängig vom Energienanteil des Donors, dem Molekül-Abstand, aber auch vom Förster-Radius. Letzterer beschreibt den Abstand der Fluorophore zueinander, bei dem die Energieübertragung zu 50 % erfolgt, und liegt typischerweise im Bereich von 20– 80 \AA .

In dieser Arbeit kam die nicht-destruktive Methode des *Three-Cube*-FRET zur Anwendung. Die Fluoreszenz-Messungen wurden mit drei verschiedenen Filtersätzen durchgeführt, um spezifisch Donor-, Akzeptor- und FRET-Signale zu detektieren:

| | CFP/ Cerulean | FRET | YFP/ Citrine |
|---------------------|------------------|-------------------|------------------|
| Exzitation [nm] | 436 | 436 | 500 |
| Emission [nm] | 480 | 535 | 535 |
| S_{Filter} | S_{CFP} | S_{FRET} | S_{YFP} |

Die Hintergrund-Autofluoreszenz wurde vom Signal abgezogen. Das Fluoreszenz-Signal, das mit einem bestimmten Filtersatz vermessen wurde, wird als S_{Filter} bezeichnet. Das Fluoreszenz-Signal von einem speziellen CFP oder YFP Molekül wird als XFP_{Filter} bezeichnet. Die Abkürzungen D und A geben an, ob die Zellen Donor oder Akzeptor oder beides enthalten. Nach spezifischer Anregung des Donors (436 nm) zeigt sich FRET in einer verringerten Emissionsintensität des Donors (*donor quenching*, beobachtet bei 480 nm) und einer Erhöhung der Emissionsintensität des Akzeptors (*sensitized emission*, beobachtet bei 535 nm) (Abb. 9B).

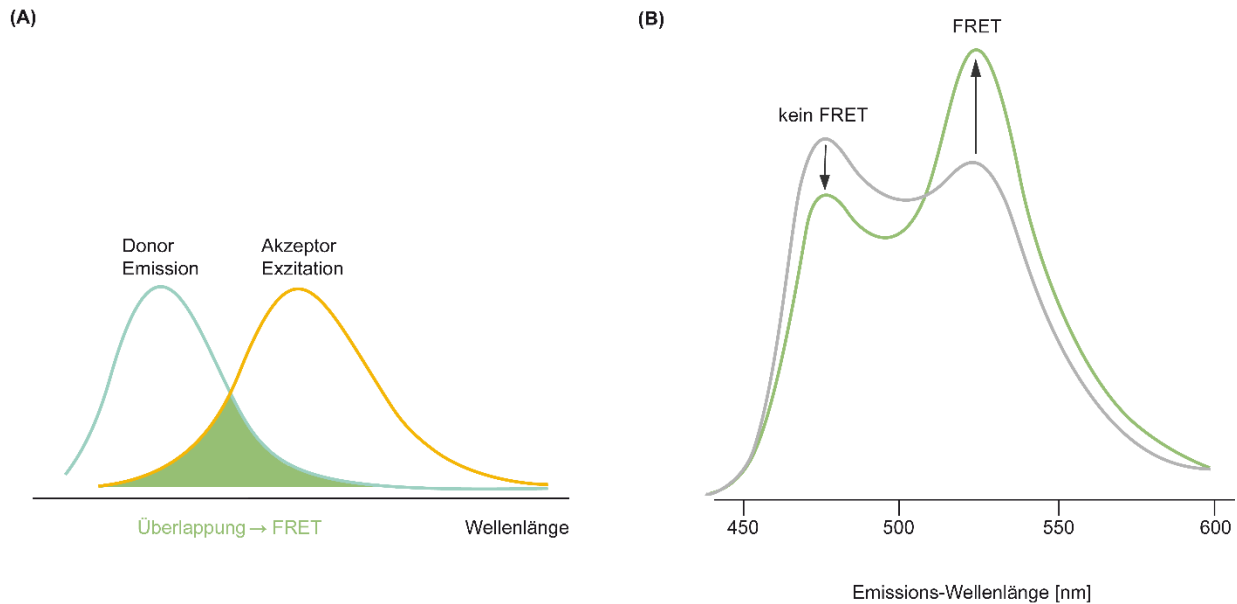


Abb. 9 Spektrale Voraussetzungen und Eigenschaften von FRET

(A) Das Emissionsspektrum eines Donor-Fluorophors und das Exzitationsspektrum eines Akzeptor-Fluorophors. FRET findet statt, wenn die Spektren überlappen. (B) Veränderung der Spektren, abhängig davon ob FRET stattfindet (grüne Linie) oder nicht (graue Linie). Beim Zustandekommen von FRET kommt es zu einem Abfall der Donor-Fluoreszenz und einem Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz.

Jedoch ist die beim FRET gemessene YFP-Emission bei 535 nm (Abb. 10, Punkt 1) nicht ausschließlich durch den Energie-Transfer bedingt. Sie ist die Summe aus dem *donor bleed through* (Abb. 10, Punkt 3), der *acceptor cross excitation* (Abb. 10, Punkt 5) und der YFP-Emission aufgrund von FRET. Somit enthält die YFP-Emission, die man beim FRET misst, folgende FRET-unabhängige Komponenten/ Störfaktoren:

(1) Der *Donor bleed through* ergibt sich aus der Überlappung der Emissionsspektren von CFP und YFP und äußert sich in einer CFP-Fluoreszenz im FRET-Filter bei ~535 nm. Für die Korrektur ist die Bestimmung der Konstante R_{D1} im CFP-Kalibrierpräparat nötig. Der *Donor bleed through* von CFP im FRET-Filterwürfel wird folgendermaßen errechnet:

$$CFP_{FRET} = R_{D1} \times S_{CFP,DA}$$

(2) Ein geringer Anteil der YFP-Fluorophore wird direkt durch Licht mit der Wellenlänge von 436 nm angeregt (*Acceptor cross excitation*). Für die Korrektur ist die Bestimmung der Konstante R_{A1} im YFP-Kalibrierpräparat nötig. Die *Acceptor cross excitation* von YFP im FRET-Filterwürfel wird folgendermaßen errechnet:

$$YFP_{FRET} = R_{A1} \times S_{YFP,DA}$$

(3) Ein meist vernachlässigbar kleiner Anteil der YFP-Emission (YFP-Filter) stammt vom co-exprimierten CFP, das durch die YFP-Exzitation mit angeregt wird (*donor cross talk*). Für die Korrektur ist die Bestimmung der Konstante R_{D2} nötig. Der *Donor cross talk* von CFP im YFP-Filterwürfel wird folgendermaßen errechnet:

$$CFP_{YFP} = R_{D2} \times S_{CFP,DA}$$

Die FRET-Effizienz (E_A) ist proportional zum Verhältnis des Anstiegs der Akzeptor-Emissionsintensität (*sensitized emission*, Abb. 10 Punkt 4 und 5) zur direkten YFP-Exzitation (Abb. 10, Punkt 5).

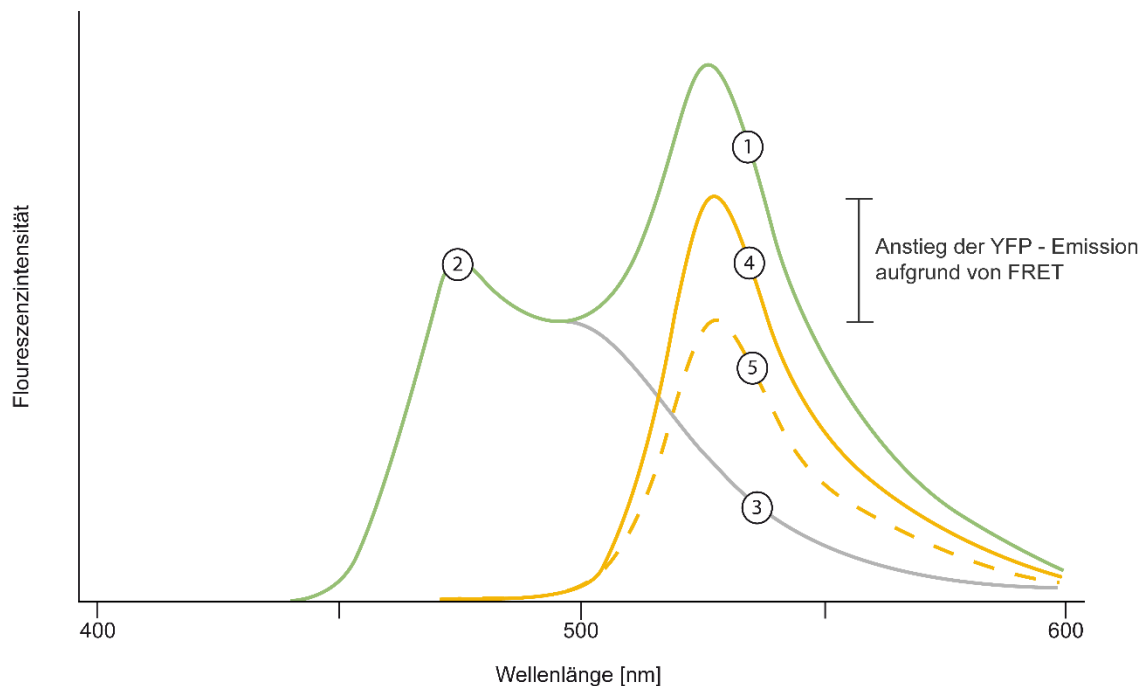


Abb. 10 Komponenten des FRET-Signals

- (1) Das gesamte Fluoreszenz-Signal bei 535 nm= donor bleed through + YFP(direkt) + YFP(FRET)
- (2) Die maximale Donor-Emission bei 480 nm= CFP(direkt)
- (3) Donor bleed through
- (4) YFP(total)= YFP(direkt) + YFP(FRET)
- (5) YFP(direkt)= Acceptor cross excitation

F_C entspricht dem Anstieg der YFP-Emission durch FRET (*sensitized emission*):

$$F_C = S_{FRET,DA} - R_{D1} \times S_{CFP,DA} - R_{A1} \times S_{YFP,DA}$$

E_A hängt von dem Anteil an gebundenem Donor (A_b) ab und wird durch eine Setup-spezifische Kalibrationskonstante korrigiert (Verhältnis der Extinktionskoeffizienten, bei unserem Setup 0,0563).

Dementsprechend wird die FRET-Effizienz, die mit der *Three-Cube*-FRET Methode ermittelt wurde, durch folgende Gleichung bestimmt:

$$E_A = E \times A_b = \frac{F_C}{R_{A1} \times S_{CFP,DA}} \times \frac{\epsilon_{YFP}(436)}{\epsilon_{CFP}(436)}$$

Um eine Bindungskurve zu erhalten, werden die kalkulierten FRET-Effizienzen (E_A) als Funktion der Konzentration an freiem Donor (D_{free}) aufgetragen. D_{free} kann mithilfe der relativen Dissoziationskonstante K_{dEFF} und den Gesamt-Konzentrationen von CFP und YFP Molekülen (CFP_{EST} und YFP_{EST}) berechnet werden, siehe (Butz et al. 2016).

Für die FRET-Messungen wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmid-DNA von Donor und Akzeptor in verschiedenen Verhältnissen zueinander transfiziert. Die FRET-Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die verwendete Badlösung hatte folgende Zusammensetzung:

FRET-Badlösung

| | |
|--|--------|
| NaCl | 140 mM |
| KCl | 5 mM |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 1 mM |
| HEPES | 10 mM |
| Glucose x 1 H ₂ O | 10 mM |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 2 mM |

Mit NaOH auf pH= 7,4 einstellen.

Die Messungen wurden an einem inversen Epifluoreszenz-Mikroskop (Leica DMI6000B) mit einem 40x Öbektiv durchgeführt. Die Exzitation erfolgte bei 436 nm ± 2,5 oder 500 nm ± 2,5 mit einem DeltaRam Monochromator (Horiba, Canada). Das Mikroskop verfügte über folgende Fluoreszenz-Filterwürfel (Chrome Technology): Einem Donor-Filterwürfel (CFP Exzitations-Filter, T455LP dichroitischer Spiegel und CFP Emissions-Filter), einem Akzeptor Filterwürfel (YFP Exzitations-Filter, T515LP dichroitischer Spiegel und YFP Emissions-Filter) und einem FRET Filterwürfel (CFP Exzitations-Filter, T455LP dichroitischer Spiegel und YFP Emissions-Filter). Die Emission wurde mit einem Photomultiplier detektiert (PMT 914) und die Messwerte auf einen Computer unter Verwendung der FelixGX Software (Horiba, Canada) übertragen. Die Datenanalyse erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft).

3.8 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Yu-Kai Chao durchgeführt und ausgewertet.

3.9 Blut- und Organentnahme

Die Blut- und Organentnahme erfolgte nach dem Protokoll von (Teupser, Persky, and Breslow 2003). Am Tag der Sektion wurde den 34 Wochen alten Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen unter Beibehaltung der Wasserzufuhr. Anschließend wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Injektion einer gewichtsabhängigen Dosis einer Mischung aus Xylazin (Injektionslösung, 2% Bayer) und Ketamin (Injektionslösung 10%, WDT) im Verhältnis 1: 4 anästhesiert.

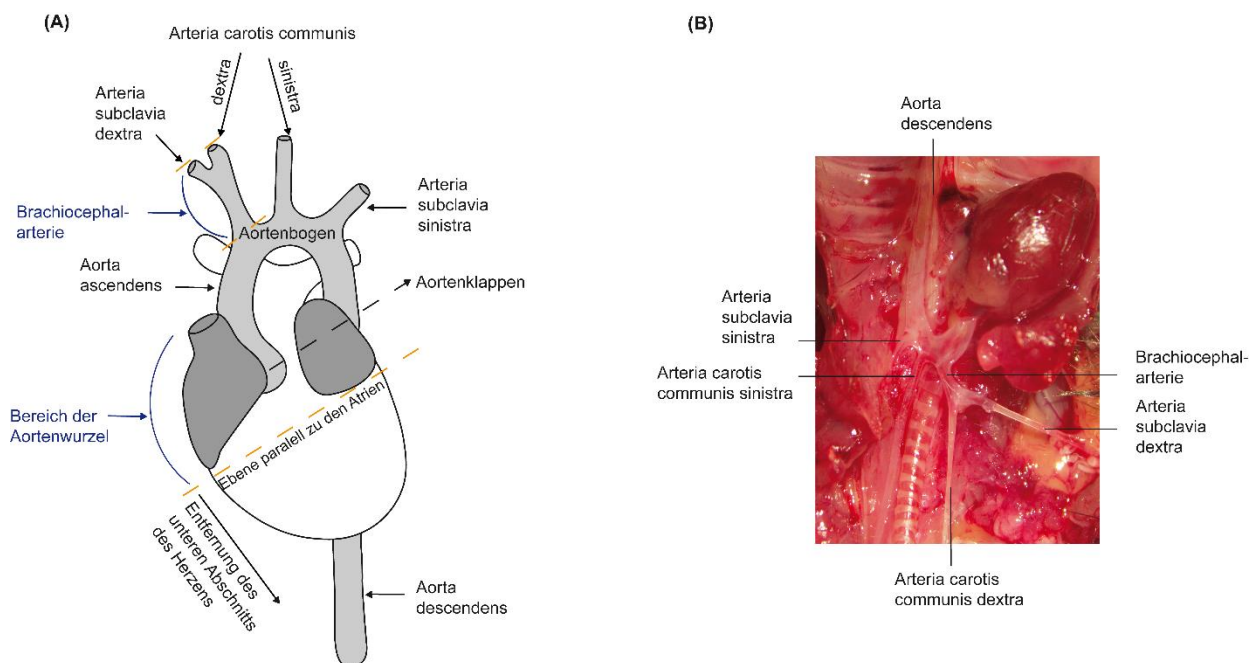


Abb. 11 Überblick über die für die Läsionsanalyse wichtigen Gefäßabschnitte

(A) *In-situ* Darstellung der Brachiocephalarterie, des Herzens und der Aorta.

(B) Schematische Abbildung der Gefäßabschnitte, die für die Quantifizierung benötigt werden. Adaptiert nach der Vorlage von (Andres-Manzano, Andres, and Dorado 2015).

In ausreichend tiefer Narkose erfolgten die Öffnung des Brustkorbes und die Blutentnahme mittels Herzpunktion aus dem rechten Ventrikel. Die dabei verwendete Spritze enthielt das Antikoagulans EDTA (Sigma Aldrich). Die Gewinnung von Plasma erfolgte durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 8000 rpm. Das rechte Herzohr wurde geöffnet und das

Gefäß- und Organsystem mit 10 ml PBS (Sigma Aldrich), dem Heparin (Heparin-Na-25000-ratiopharm, 25000 i.E.) zugesetzt wurde (Mischungsverhältnis 1000: 1), durch den linken Ventrikel perfundiert. Anschließend wurde die Leber entfernt und gewogen. Die Präparation der für die Quantifizierung der Atherosklerose benötigten Gefäßabschnitte erfolgte durch Freilegung der Aortenwurzel, des Aortenbogens sowie der Brachiocephalarterie (Abb. 11A). Die Arteria brachiocephalica wurde an ihrer Abzweigung von der Aorta und distal von ihrer Gabelung in die Arteria carotis communis dextra und die Arteria subclavia dextra abgetrennt und entnommen. Nach dem Durchschneiden der Aorta ascendens oberhalb der Aortenwurzel konnte das Herz entnommen und der untere Abschnitt des Herzens entfernt werden. Der Schnitt musste parallel zu den Atrien gesetzt werden, sodass bei einem Querschnitt alle drei Klappentaschen in derselben Ebene lagen (Abb. 11B). Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebe in Einbettmedium (OCT, TissueTek) bei -20 °C eingefroren. Bis zur Anfertigung der Schnitte wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die restliche *en face* Aorta wurde bis zur Aortengabel freipräpariert, entnommen und in PBS gewaschen.

Die Isolation der Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation wurde vom Institut für Laboratoriumsmedizin der LMU München durchgeführt. Die Konzentration wurde enzymatisch mit einer kolorimetrischen Methode (Roche) ermittelt. Die quantitative Bestimmung der LDL-Subpopulationen erfolgte am Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, Oakland) durch Ionen-Mobilitäts-Analyse (Caulfield et al. 2008).

3.10 Histologische Analyse der atherosklerotischen Plaques

3.10.1 Gefrierschnitte

Zur Quantifizierung der Größe atherosklerotischer Läsionen wurden histologische Schnitte der Brachiocephalarterie und der Aortenwurzel angefertigt. Dabei betrug die Schnitttemperatur -20 °C. Die 10 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträgern aufbewahrt und bis zur Öl-Rot-O-Färbung bei -80 °C tiefgefroren.

Die Y-förmige Brachiocephalarterie wurde so in das Kryotom eingespannt, dass die Arterien carotis communis und subclavia zuerst geschnitten wurden. Der erste Schnitt, bei dem beide Arterien zu einem Gefäß vereint waren, wurde als Startpunkt definiert. 200, 400 und 600 µm nach diesem Punkt wurden je 2 Schnitte für die Quantifizierung der Arteriosklerose gesammelt (Objektträger 1A, 2A, 3A).

Das Herz wird so in das Kryotom eingespannt, dass die Schnitte aus dem Herzen in Richtung Aorta erfolgten. Ab dem Erscheinen von einer vollständigen Taschenklappen-zirkumferenz in der Aortenklappenebene wurden die Schnitte gesammelt. Alle 60 µm waren 2 Schnitte für die spätere Öl-Rot-O-Färbung bestimmt (Objektträger 1A, 2A, ...). Als Endpunkt wurde das Erscheinen der ersten Wurzel (ohne Klappenansätze) definiert.

3.10.2 *En face* Lipidfärbung

Die En-face Öl-Rot-O-Färbung erfolgte nach einem Protokoll von (Feil et al. 2014). Öl-Rot-O ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, durch den neutrale Lipide wie Cholesterolester und Triglyceride rot angefärbt werden. Alle Lösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt. Die Aorten wurden 5 Minuten in 78 %igem MeOH und anschließend 60 Minuten in Öl-Rot-O-Färbelösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch erneutes, fünfminütiges Waschen mit 78 %igem MeOH entfernt. Die gefärbten Aorten konnten in PBS bei 4°C für wenige Tage gelagert werden. Die Dokumentation erfolgte mittels Stereomikroskop (Olympus SZX7) und dazugehöriger Kamera (Olympus DP25).

Öl-Rot-O Stocklösung

| | |
|--------------------------|--------|
| Öl-Rot-O (Sigma-Aldrich) | 0,1 g |
| MeOH 100 % | 100 ml |

5 Minuten rühren, 3 Mal durch einen Faltenfilter (VWR) filtrieren und lichtgeschützt lagern.

Öl-Rot-O-Färbelösung

| | |
|----------------------|-------|
| NaOH 1 M | 10 ml |
| Öl-Rot-O Stocklösung | 35 ml |

3.10.3 Öl-Rot-O-Färbung von Gefrierschnitten

Zur Quantifizierung der Größe der atherosklerotischen Plaques wurden die Schnitte 1A, 2A und 3A der Brachiocephalararterien und alle A-Objektträger der Aortenwurzeln einer histologischen Färbung mit Öl-Rot-O, Lichtgrün und Haematoxylin unterzogen. Dabei färbt Öl-Rot-O die intra- und extrazellulären Lipide rot, Haematoxylin die Zellkerne blau und Lichtgrün

die elastischen Fasern grün. Eine Schicht elastischer Fasern (Lamina elastica interna) stellt die Grenze zwischen Intima und Media dar.

Die Fixierung erfolgte in formalingesättigten Kammern (Formalin Lösung, neutral gepuffert, 10 %, Sigma-Aldrich) bei 4 °C über Nacht. Die Färbung wurde mechanisiert von einem Färbegerät (Shandon Varistain Gemini) durchgeführt. Dabei wurden die Objektträger mit H₂O gewaschen (2x 1 Min.), in 60 %igen Isopropanol gegeben (30 Sek.), mit Öl-Rot-O Färbelösung gefärbt (10 Min.) und wieder mit 60 %igem Isopropanol (2 Min.) und H₂O (2x 1 Min.) gewaschen. Darauf folgten die Färbungen mit Haematoxylin-Lösung (2 Min.) und Bluing-Lösung (1 Min.), ein weiterer Waschschrift (1 Min.), die Färbung mit Lichtgrün (30 Sek.) und ein letzter Waschschrift.

Die Schnitte wurden mit Glycerol-Gelatine (Merck) luftblasenfrei eingedeckelt.

Öl-Rot-O Stocklösung

| | |
|--------------------------|--------|
| Öl-Rot-O (Sigma Aldrich) | 1,5 g |
| Isopropanol 100 % | 375 ml |

Über Nacht lichtgeschützt rühren lassen.

Öl-Rot-O Färbelösung

| | |
|----------------------|--------|
| Öl-Rot-O Stocklösung | 300 ml |
| H ₂ O | 200 ml |

3 Mal durch einen Faltenfilter (VWR) filtrieren.

Haematoxylin-Lösung

| | |
|------------------------------|--------|
| Haematoxylin (Sigma-Aldrich) | 160 ml |
| H ₂ O | 236 ml |
| Eisessig | 4 ml |

Bluing-Lösung

| | |
|--------------------|--------|
| MgSO ₄ | 20 g |
| NaHCO ₃ | 2 g |
| H ₂ O | ad 1 l |

Lichtgrün-Stocklösung

| | |
|--------------------------------|--------|
| Lichtgrün (Sigma-Aldrich) | 2 g |
| H ₂ O | 198 ml |
| 100 %ige Essigsäure (Eisessig) | 2 ml |

Lichtgrün-Gebrauchslösung

| | |
|-----------------------|--------|
| Lichtgrün-Stocklösung | 20 ml |
| H ₂ O | 380 ml |

3.10.4 Auswertung von histologischem Material

Mit Hilfe eines Zeiss-Mikroskops (Axioskop) wurden Bilder der Brachiocephalararterien (Vergrößerung 10-fach) und der Aortenwurzel (Vergrößerung 5-fach) angefertigt und digital gespeichert (AxioVision). Die Quantifizierung der Plaques luminal der Lamina elastica interna erfolgte mit der LasX-Software (Leica). Für die Quantifizierung der Plaque-Fläche der Brachiocephalararterie wurden 3 Objektträger (1A, 2A, 3A) verwendet. Bei der Aortenwurzel wurden die letzten 5 A-Objektträger vor dem Endpunkt zur Quantifizierung herangezogen. Die Plaquefläche ergab sich aus dem Mittelwert der Fläche der Läsionen der Schnitte.

3.11 Statistik

Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit der PRISM Statistik-Software (GraphPad). Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk Test geprüft. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels T-Test für unverbundene Stichproben analysiert. Unterschiede zwischen mehreren Gruppen (≥ 3) wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Abhängig von der Anzahl der experimentell bestimmten Faktoren wurden einfaktorielle (One-Way-ANOVA) und zweifaktorielle ANOVAs (mehrfaktorielle ANOVA) zur Datenanalyse verwendet. Mit der Varianzanalyse wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von mindestens zwei Proben bestanden. War dies der Fall, wurde ein post hoc Test verwendet, um zu ermitteln welche Mittelwerte signifikante Unterschiede zueinander aufwiesen. Mit Hilfe der multifaktoriellen ANOVA konnte überprüft werden, ob es innerhalb der einzelnen Faktoren signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei Faktoren gab.

Außerdem wurde überprüft, ob signifikante Wechselwirkungen (Interaktionen) zwischen den Faktoren bestanden. Bei einem p-Wert unter 0,05 wurde das Ergebnis eines statistischen Tests als „signifikant“ bezeichnet. Zusätzlich wurden Angaben zum Mittelwert \pm dem Standardfehler (SEM) gemacht.

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss des hTPC2 auf die Haarfarbe

In einer genomweiten Assoziationsstudie wurden die polymorphen Varianten hTPC2-M484L und hTPC2-G734E identifiziert und mit blonder Haarfarbe in Verbindung gebracht (Sulem et al. 2008). Das warf die Frage nach Mechanismen auf, die diese Assoziation zwischen dem TPCN2-Gen und seinem Phänotypen erklären können und damit ein besseres Verständnis der physiologischen Funktion des TPC2 ermöglichen.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit wesentliche Eigenschaften des hTPC2-WT wie die subzelluläre Lokalisation, der Vacuolin-Effekt, das Expressionslevel in endolysosomalen Membranen, die Dimerisierung und die Sensitivität gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren überprüft und mit denen der polymorphen hTPC2-Varianten verglichen.

4.1.1 Subzelluläre Lokalisation, Expressionslevel, Vacuolin-Effekt und Dimerisierung der verschiedenen hTPC2-Varianten in HEK293-Zellen

Ein wesentliches Charakteristikum des TPC ist seine Lokalisation in der Membran saurer Organellen, die durch Vacuolin-1 vergrößert werden können. Für die konfokal-mikroskopische Analyse wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmiden transfiziert, die zur Expression der hTPC2-Varianten unter der Kontrolle eines CMV-Promotors führten. Zur Visualisierung der hTPC2-Varianten waren diese zusätzlich C-terminal mit YFP markiert. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit LysoTracker® Deep Red oder mit dem zellmembrangängigen, zyklischen Triazin Vacuolin-1 (Huynh and Andrews 2005).

Die Varianten des hTPC2 fanden sich überwiegend in intrazellulären, vesikulären Strukturen. Es zeigte sich eine starke Kolo-kalisation TPC2-positiver Strukturen mit LysoTracker® Deep Red, der sich in sauren Zellorganellen anreichert (Abb. 12A). Eine quantitative Analyse ergab eine vergleichbare Kolo-kalisation der verschiedenen hTPC2-Varianten mit LysoTracker® Deep Red (Korrelationskoeffizienten nach Pearson, PCC, p-Wert= 0,969) (Abb. 12B). Somit konnte eine vergleichbare endolysosomale Lokalisation des hTPC2-WT und der polymorphen hTPC2-Varianten bestätigt werden.

Zudem zeigten nach Inkubation der transfizierten Zellen mit Vacuolin-1 die verschiedenen hTPC2-Varianten vergrößerte Vesikel vergleichbaren Ausmaßes (Abb. 12C).

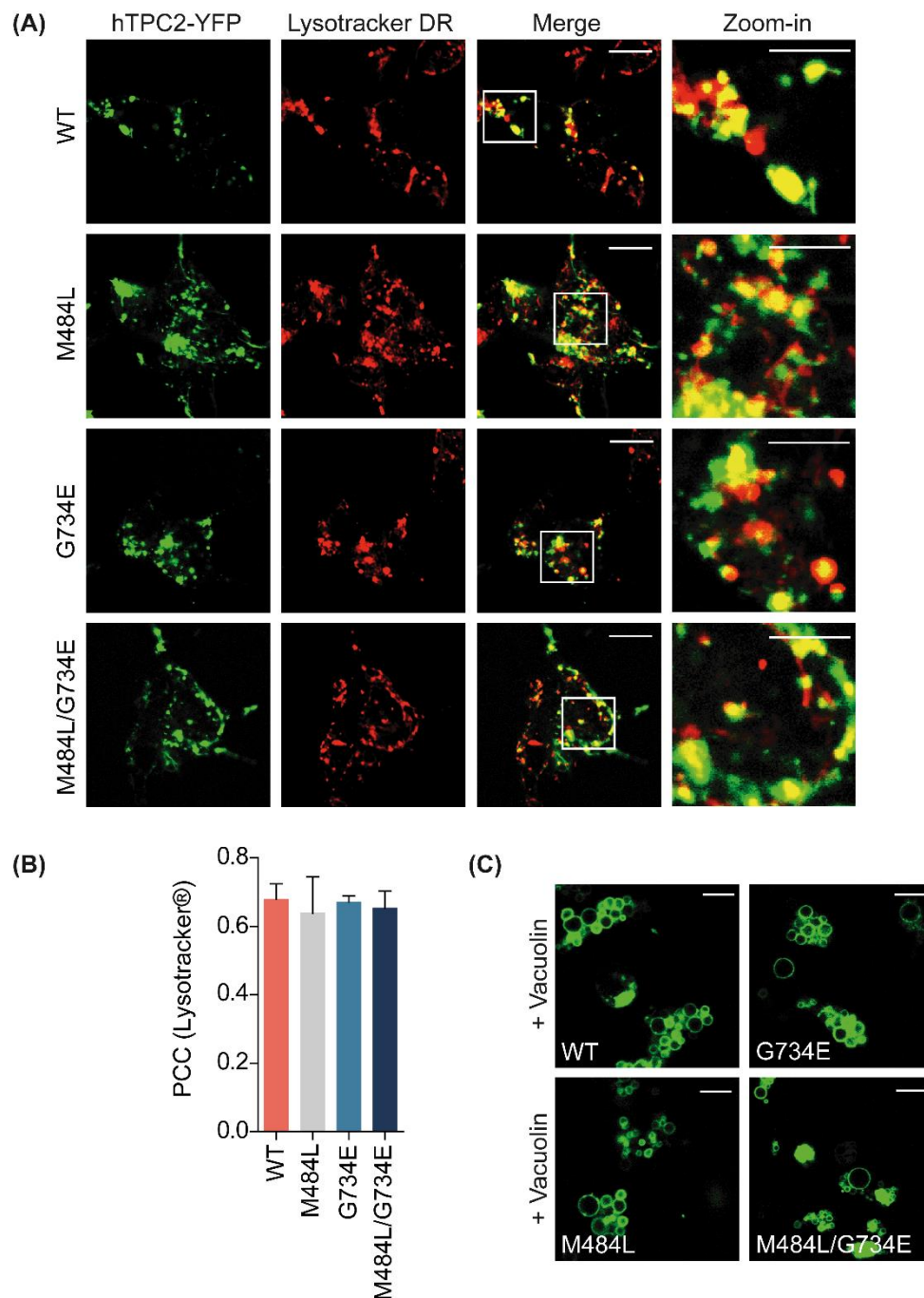


Abb. 12 Subzelluläre Lokalisation und Vacuolin-Effekt des hTPC2-WT und seiner polymorphen Varianten in HEK293-Zellen

(A) Repräsentative Konfokalmikroskopie-Bilder von lebenden Zellen, die transient entweder mit hTPC2-WT oder den polymorphen Varianten transfiziert und anschließend mit Lysotracker® Deep Red inkubiert wurden. Eine Überlappung der Signale ist durch die gelbe Farbe dargestellt. Skalierung 10 μm . Die rechte Reihe ist die jeweilige Vergrößerung des Inserts der Reihe nebenan; Skalierung 5 μm . (B) Kalkulation der Korrelationskoeffizienten nach Pearson anhand der Bilder, die in (A) gezeigt sind. PCC hTPC2-WT: $0,679 \pm 0,045$, hTPC2-M484L: $0,6388 \pm 0,106$, hTPC2-G734E: $0,671 \pm 0,0182$, hTPC2-M484L/G734E: $0,653 \pm 0,0503$; Einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test. (C) Repräsentative Konfokalmikroskopie-Bilder von lebenden Zellen, die transient entweder hTPC2-WT oder den polymorphen Varianten transfiziert und anschließend mit Vacuolin-1 behandelt worden waren; Skalierung 10 μm .

Zur Beurteilung der Expressionslevel der hTPC2-Varianten in endolysosomalen Membranen wurden Endolysosomen aus HEK293-Zellen isoliert. Um eine einzelne, klare Bande im Westernblot zu erhalten, wurden zuvor die Glycosylierungen an den Asparagin-Resten der TPC2-Proteine mit PNGase F entfernt (Hooper et al. 2011). Der Nachweis der hTPC2-YFP Fusionsproteine im Westernblot erfolgte mittels anti-GFP Antikörper (Abb. 13A). Das lysosomale Protein Rab7 ist nicht reguliert und diente daher als endogene Referenz. Für die quantitative Analyse wurden 3 biologische Replikate verwendet. Die Expression der hTPC2-Varianten in endolysosomalen Membranen, normiert auf Rab7, zeigte keinen signifikanten Unterschied (p-Wert= 0,644) (Abb. 13B).

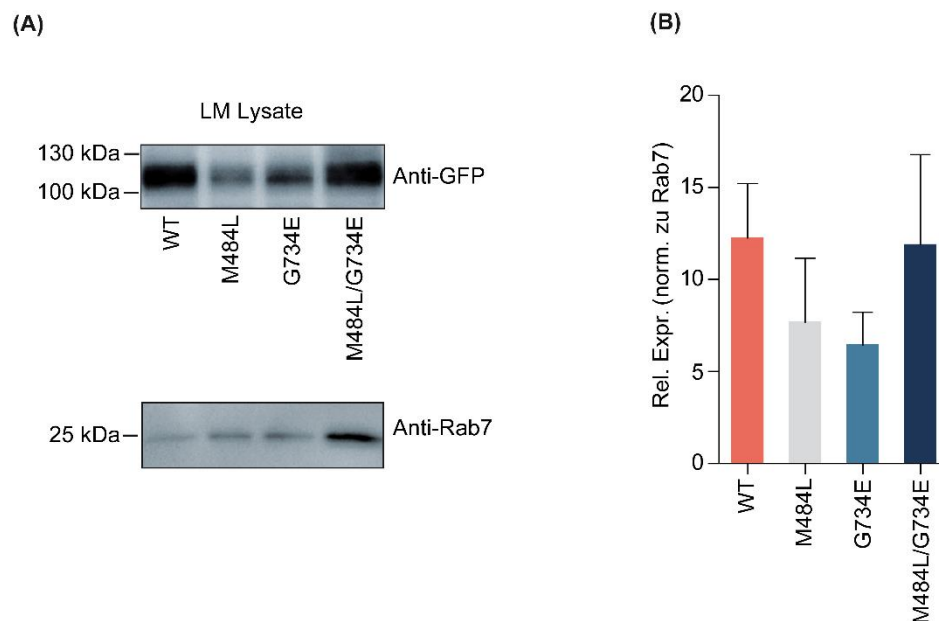
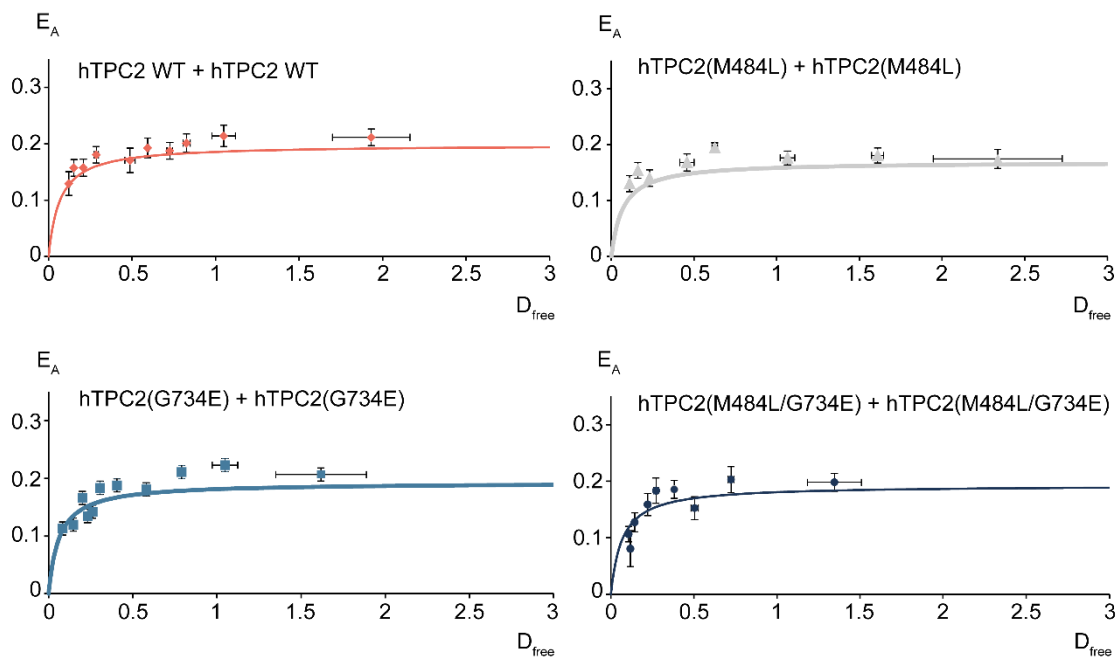


Abb. 13 Expressionslevels des hTPC2-WT und seiner polymorphen Varianten in endolysosomalen Membranen von HEK293 Zellen

(A) Exemplarischer Westernblot von hTPC2-WT und den polymorphen Varianten, die aus endolysosomalen Membranen isoliert und mit einem anti-GFP Antikörper detektiert wurden. Als Referenz wurde endogenes Rab7 verwendet. (B) Quantifizierung der Westernblot Daten, die in (A) gezeigt sind. Relative Expression: hTPC2-WT: $12,3 \pm 2,96$, hTPC2-M484L: $7,69 \pm 3,47$, hTPC2-G734E: $6,46 \pm 1,76$, hTPC2-M484L/G734E: $11,9 \pm 6,11$; $n = 3$ unabhängige Experimente (Biologische Replikate); einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test.

Eine weitere, wesentliche Eigenschaft von TPCs ist die Dimerisierung zweier Untereinheiten zu einem Kanal. Die Analyse dieser Bindungsaffinitäten erfolgte über Förster-Energie-Resonanz-Transfer (FRET) Messungen (Butz et al. 2016).

(A)



(B)

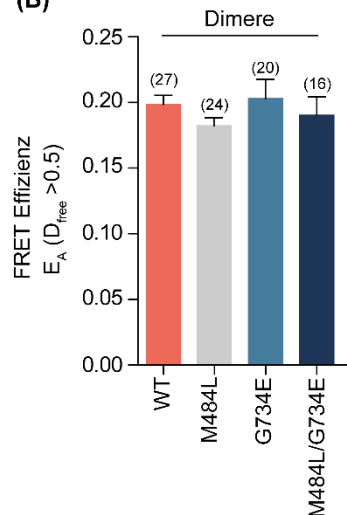


Abb. 14 Dimerisierungs-Effizienz des hTPC2-WT und seiner polymorphen Varianten in HEK293-Zellen

(A) Bindungskurven der verschiedenen hTPC2-Dimere. Zur Erstellung einer Bindungskurve wurden die FRET Effizienzen (E_A) der in Gruppen zusammengefassten Messwerte gegen die freie Donorkonzentration (D_{free}) aufgetragen. (B) Statistische Zusammenfassung der Daten, die in (A) gezeigt wurden. Es wurden nur Messwerte im gesättigten Bereich verglichen ($D_{free} > 0.5$). E_A hTPC2-WT: $0,199 \pm 0,00676$, hTPC2-M484L: $0,182 \pm 0,0061$, hTPC2-G734E: $0,203 \pm 0,0146$, hTPC2-M484L/G734E: $0,190 \pm 0,0142$; n= mindestens 3 unabhängige Experimente (biologische Replikate); Einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test.

Dazu wurden die verschiedenen Fusionsprotein-Paare transient in HEK298-Zellen co-transfiziert. Bei den Bindungskurven in Abbildung 14A ist die FRET Effizienz (E_A) in Abhängigkeit von der freien Donorkonzentration (D_{free}) dargestellt. Eine Interaktion kann

mithilfe der Bindungsparameter E_A und $K_{d, \text{Eff}}$ analysiert werden. Die FRET-Effizienz E_A reflektiert die räumliche Anordnung der beiden Fusions-Proteine im Komplex. $K_{d, \text{Eff}}$ ist ein Maß für die relative Bindungsaffinität. Die FRET-Messungen zeigten ähnliche $K_{d, \text{Eff}}$ -Werte ($0,065 \pm 0,003$) und E_A -Werte im gesättigten Bereich ($0,193 \pm 0,010$) und damit eine vergleichbare Dimerisierungs-Effizienz der verschiedenen hTPC2-Varianten (p-Wert= 0,477) (Abb. 14B). Zusammenfassend kann man sagen, dass die verschiedenen hTPC2-Varianten vergleichbare Eigenschaften im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation, den Vacuolin-Effekt, das Expressionslevel und die Dimerisierungs-Effizienz aufweisen. Somit wurde ein HEK-Zell-Expressionssystem für alle hTPC2-Varianten etabliert, das tiefgehende Analysen der weiteren Kanaleigenschaften ermöglichte.

4.1.2 Die Sensitivität der verschiedenen hTPC2-Varianten gegenüber dem Aktivator $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ in HEK293-Zellen

Ob ein Unterschied in der Sensitivität gegenüber dem endogenen Aktivator $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ zwischen dem hTPC2-WT und den polymorphen hTPC2-Varianten vorliegt, wurde mittels Elektrophysiologie überprüft. Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Yu-Kai Chao durchgeführt und ausgewertet. Es wurden Ionenströme von aus HEK293-Zellen isolierten Lysosomen gemessen, die die hTPC2-Varianten exprimierten und mit Vacuolin-1 vergrößert worden waren. Der Zusatz des Phospholipidderivats $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ zur Badlösung führte zu einer Aktivierung des hTPC2 und zu einem transienten Einstrom von Na^+ aus dem lysosomalen Lumen in das Zytosol. Die Kanalaktivität der polymorphen Variante hTPC2-M484L war im Vergleich zum hTPC2-WT signifikant erhöht, sowohl basal als auch nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$. Die Kanalaktivität der polymorphen Variante hTPC2-G734E war ähnlich der des hTPC2-WT (Chao et al. 2017).

Die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve von $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ ergab, dass für die Variante hTPC2-M484L weniger $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ nötig ist ($\text{EC}_{50, \text{M484L}} = 216 \pm 55 \text{ nM}$), um die halbmaximale Aktivierung zu erreichen, verglichen mit hTPC2-WT ($\text{EC}_{50, \text{WT}} = 1138 \pm 376 \text{ nM}$) und hTPC2-G734E ($\text{EC}_{50, \text{G734E}} = 827 \pm 183 \text{ nM}$). Zudem wurde bei der Variante hTPC2-M484L ein höheres Wirkmaximum von $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ erreicht (Abb. 15).

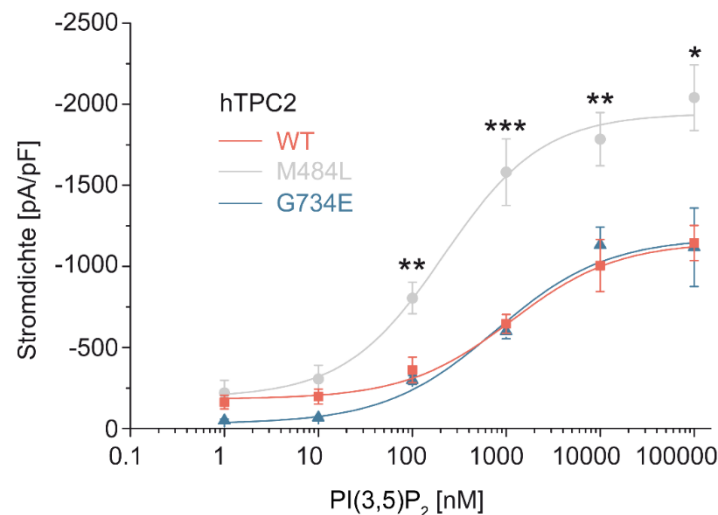


Abb. 15 PI(3,5)P₂ Dosis-Wirkungs-Kurven für hTPC2-WT, hTPC2-M484L und hTPC2-G734E

Die Ströme wurden durch 500 Millisekunden lange Spannungsrampen zu Potentialen von -100 bis +100 mV alle 5 Sekunden aktiviert; Einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Bei 100nM PI(3,5)P₂: p-Wert= 0.0008, n= 8 (hTPC2-WT), 7 (hTPC2-M484L), 9 (hTPC2-G734E); bei 1000nM PI(3,5)P₂: p-Wert= 0.000000004; n= 46 (hTPC2-WT), 30 (hTPC2-M484L), 28 (G734E); bei 10000nM PI(3,5)P₂: p-Wert= 0.0004; n=10 (hTPC2-WT), 8 (hTPC2-M484L), 10 (hTPC2-G734E). Die Patch-Clamp-Messungen wurden von Yu-Kai Chao durchgeführt.

4.1.3 Die Sensitivität der verschiedenen hTPC2-Varianten gegenüber den Inhibitoren ATP/ mTOR in HEK293-Zellen

Wie zuvor erläutert, kann der TPC-vermittelte Strom durch ATP inhibiert werden (Cang et al. 2013). Die elektrophysiologische Analyse der aus HEK293-Zellen isolierten Endolysosomen, die entweder hTPC2-WT oder hTPC2-G734E exprimierten, erfolgte mit ATP in der Badlösung. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde nach Kanalaktivierung durch PI(3,5)P₂ unter Verwendung steigender ATP-Konzentrationen erstellt.

Interessanterweise ist die Dosis-Wirkungs-Kurve für ATP bei der polymorphen Variante hTPC2-G734E im Vergleich zum hTPC2-WT nach rechts verschoben. Das bedeutet, dass eine höhere ATP-Konzentration nötig ist, um den hTPC2-G734E zu hemmen (bei 300 μ M ATP signifikant erhöhte Stromdichte, p-Wert= 0.04). Die ATP-IC₅₀-Werte betrugen bei Verwendung von PI(3,5)P₂-Konzentration entsprechend der jeweiligen EC₅₀-Werte 91 ± 19 μ M für hTPC2-WT, 102 ± 6 μ M für hTPC2-M484L und 325 ± 237 μ M für hTPC2-G734E. Die Verwendung hoher ATP-Konzentrationen (1 mM) führte bei allen hTPC2-Varianten zu einem effizienten Block der Kanalaktivität (Abb. 16).

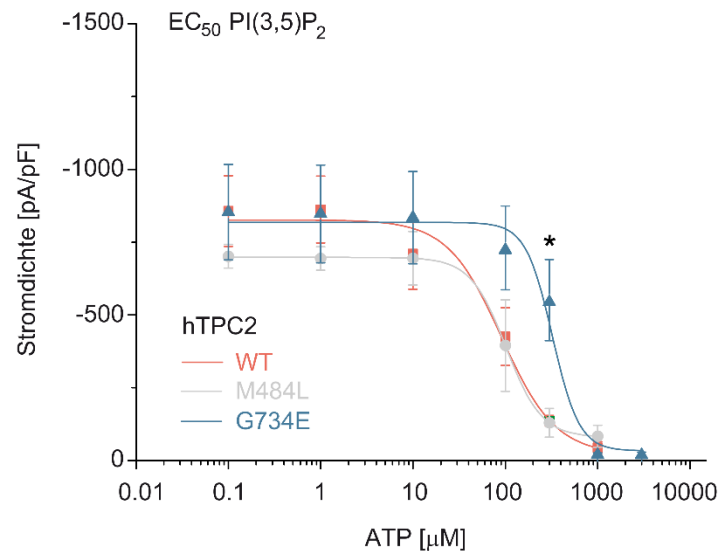


Abb. 16 ATP Dosis-Wirkungs-Kurve für hTPC2-WT, hTPC2-M484L und hTPC2-G734E

Zur Aktivierung des Kanals wurden die jeweiligen PI(3,5)P₂-EC₅₀-Konzentrationen verwendet, zur Blockade des Kanals steigende ATP-Konzentrationen. Die Ströme wurden durch 500 Millisekunden lange Spannungsrampen zu Potentialen von -100 bis +100 mV alle 5 Sekunden aktiviert. Einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test; * $p < 0.05$. bei 300 µM ATP: $n = 7$ (hTPC2-WT), 4 (hTPC2-M484L), 9 (hTPC2-G734E). Die Patch-Clamp-Messungen wurden von Yu-Kai Chao durchgeführt.

Die Daten von (Cang et al. 2013) sprechen dafür, dass die ATP-Hemmung des TPC2 nicht über eine direkte Bindung, sondern indirekt über Kinasen wie mTOR erfolgt. Daher wurde zunächst mTOR-CFP und mit den verschiedenen hTPC2-YFP-Varianten in der Zelllinie HEK293 co-exprimiert und die Auswirkung der Co-Expression auf die subzelluläre Protein-Lokalisation analysiert.

Wie schon andere Publikationen gezeigt haben (Manifava et al. 2016; Yadav et al. 2013), ist mTOR bei einer Einzelexpression in HEK293-Zellen vorwiegend im Zytoplasma zu finden (Abb.17A). Interessanterweise ist im Gegensatz dazu bei einer Co-Expression sowohl mit hTPC2-WT als auch mit den polymorphen Varianten eine Translokation von mTOR zu intrazellulären, vesikulären Strukturen zu beobachten. Es zeigte sich, dass die hTPC2-Varianten mit mTOR colokalisieren (Abb. 17B).

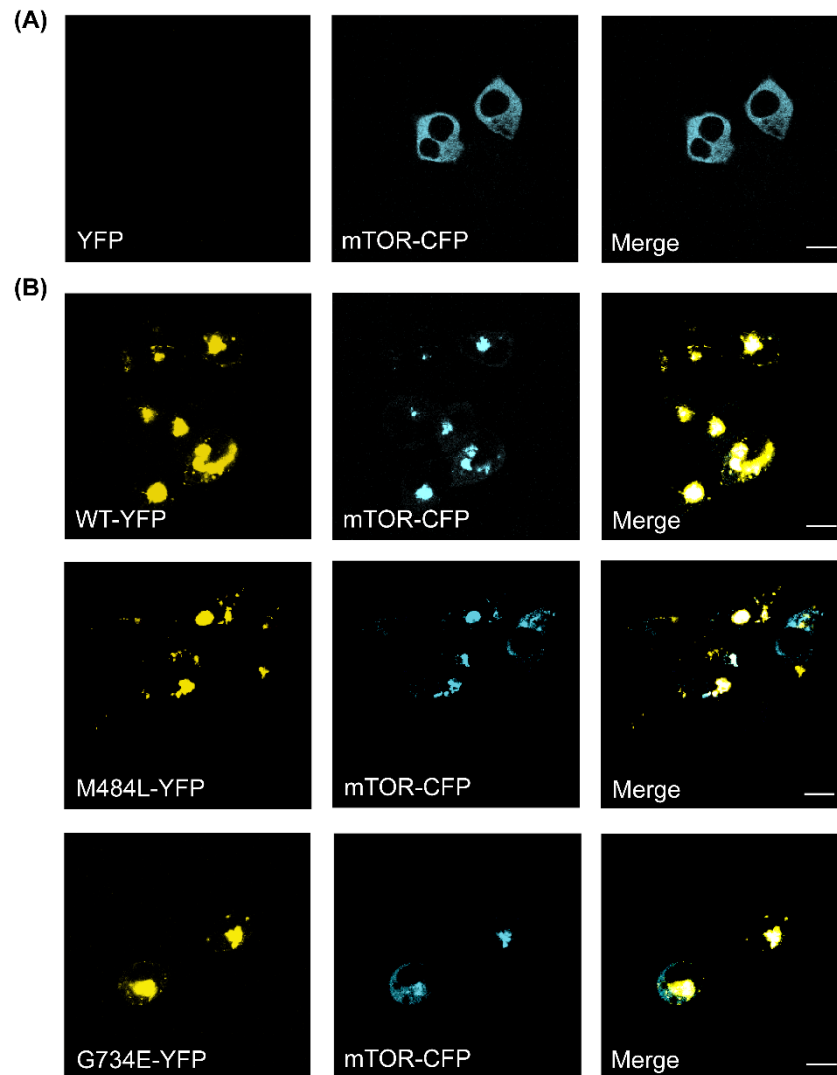


Abb. 17 Rekrutierung von mTOR zu endolysosomalen Organellen in der Gegenwart des hTPC2-WT und der polymorphen hTPC2-Varianten

(A) Repräsentative Konfokalmikroskopie-Bilder von mTOR-CFP, alleine exprimiert in HEK293-Zellen.

(B) Repräsentative Konfokalmikroskopie-Bilder von mTOR-CFP, co-exprimiert mit entweder hTPC2 WT oder den polymorphen hTPC2-Varianten in HEK293-Zellen; Skalierung= 10 μ m.

Zur Analyse der Protein-Interaktion wurden Coimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen mit Flag-mTOR und entweder mit hTPC2-WT oder einer der polymorphen hTPC2-Varianten, alle C-terminal mit YFP markiert, co-transfiziert (Abb. 18A). Die resultierenden Proteinlysate wurden mit dem anti-GFP Antikörper und Protein-A Dynabeads präzipitiert und per Westernblot analysiert. Als Negativkontrolle dienten Lysate, die nur mTOR enthielten. Als Positivkontrolle dienten Lysate, die anstelle von mTOR den verifizierten Interaktor Myc-Stx7 enthielten (Grimm et al. 2014).

Die Coimmunopräzipitations-Experimente zeigten, dass alle hTPC2-Varianten mit mTOR interagieren. Wichtig war zudem, dass keine spezifische mTOR-Bande bei 289 kDa in den Lysaten beobachtet werden konnte, in denen mTOR alleine exprimiert wurde (Abb.18B).

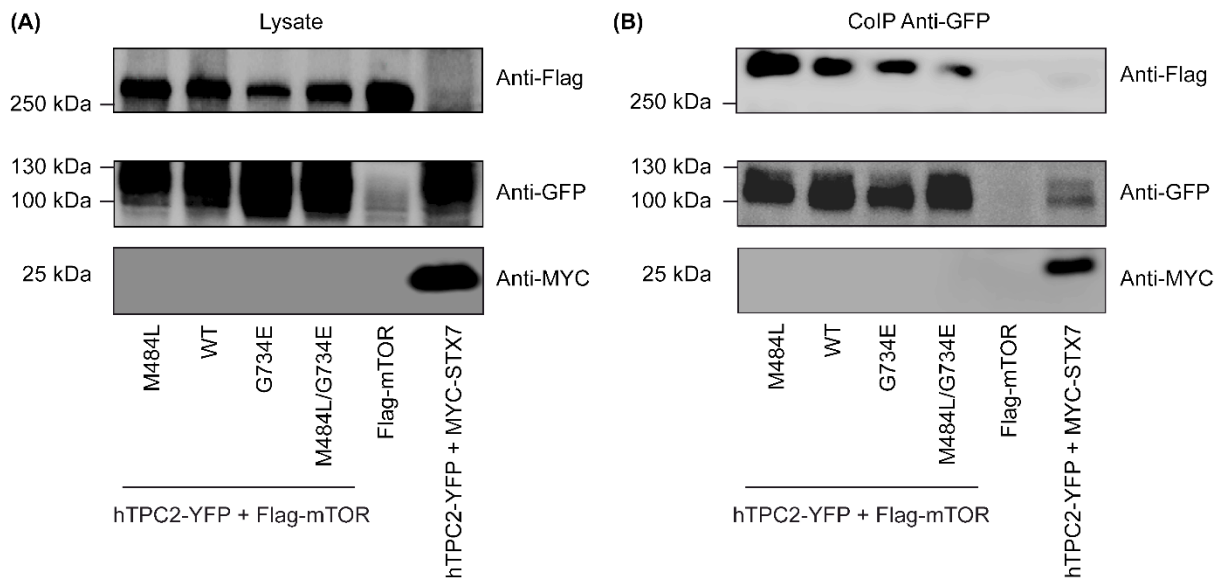


Abb. 18 Sowohl hTPC2-WT als auch die polymorphen hTPC2-Varianten interagieren mit mTOR

(A) Exemplarischer Westernblot von einem Zehntel des Lysats, das anschließend für die Coimmunopräzipitation verwendet wurde. Die Proben wurden mit einem Antikörper gegen GFP (hTPC2-YFP), einem Antikörper gegen Flag (Flag-mTOR) und einem Antikörper gegen Myc (Myc-Stx7) detektiert. (B) Exemplarischer Westernblot der Coimmunopräzipitationen von Lysaten aus HEK293-Zellen, die mit mTOR und entweder hTPC2-WT oder den polymorphen hTPC2-Varianten co-exprimiert wurden.

Um die Stärke der Interaktion quantitativ zu bestimmen, wurden FRET-Messungen in lebenden Zellen durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Fusions-Protein-Paare transient in HEK293-Zellen co-transfiziert. In der Negativkontrolle diente der Citrine-Leervektor anstelle von mTOR als FRET-Partner. Übereinstimmend mit den Coimmunopräzipitationsdaten wurden robuste FRET-Signale für die hTPC2-Varianten mit mTOR erhalten (Abb. 19A). Bei der hTPC2-G734E Variante waren die E_A -Werte im gesättigten Bereich vergleichbar mit denen des hTPC2-WT (p -Wert= 0,0830) (Abb. 19B), der K_d -Wert jedoch höher ($K_{dEFF, hTPC2-WT}$ = 0,160; $K_{dEFF, hTPC2-G734E}$ = 0,507). Möglicherweise wird die Affinität der Serin-Threonin-Kinase mTOR an den hTPC2 und damit auch ihre Wirkung durch die G734E-Mutation vermindert (Abb. 19C).

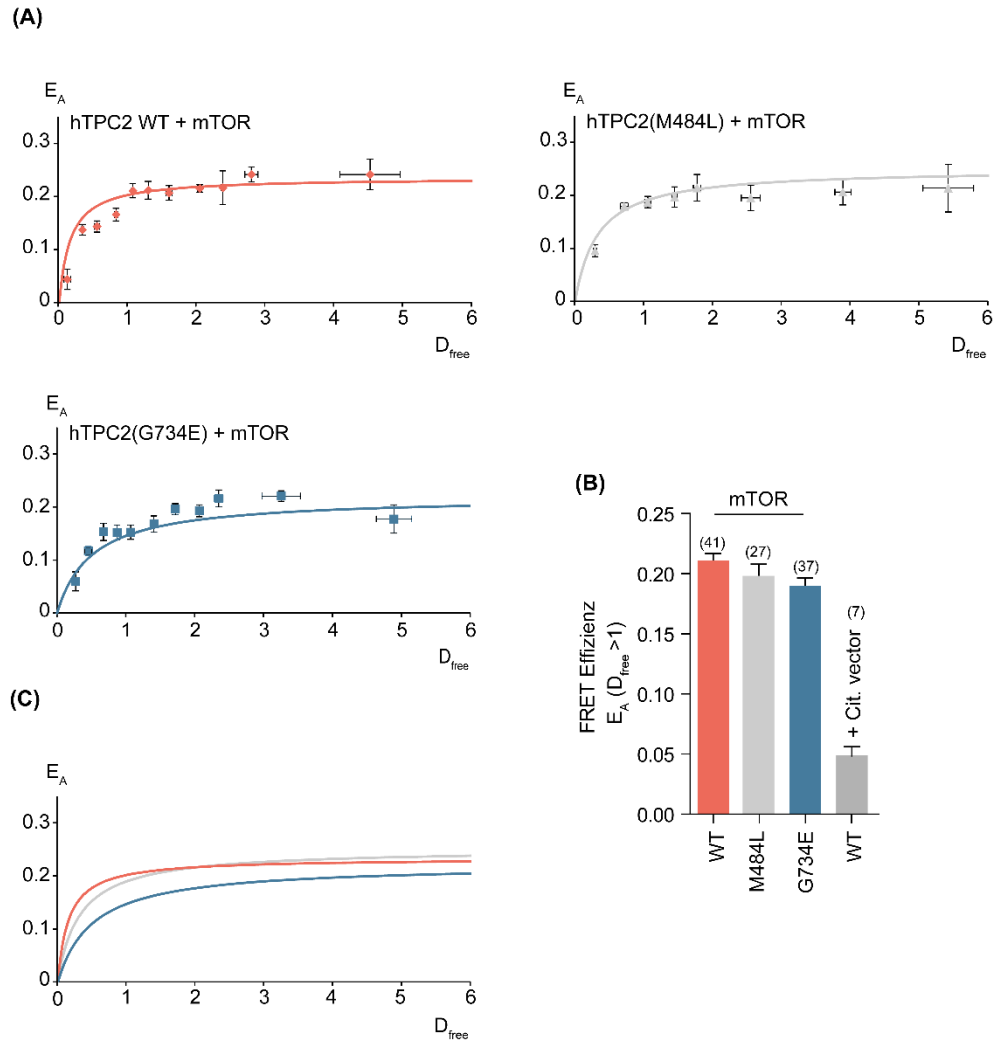


Abb. 19 Die Interaktionsstärke zwischen mTOR und hTPC2-WT oder den polymorphen hTPC2-Varianten

(A) Die FRET Effizienzen (E_A) der in Gruppen zusammengefassten Messwerte wurden gegen die freie Donorkonzentration (D_{free}) aufgetragen, um eine Bindungskurve zu erstellen. (B) Statistische Zusammenfassung der Daten, die in (A) gezeigt sind. Es wurden nur Messwerte im gesättigten Bereich verglichen ($D_{\text{free}} > 1$). E_A hTPC2-WT: $0,211 \pm 0,00616$, hTPC2-M484L: $0,197 \pm 0,0076$, hTPC2-G734E: $0,189 \pm 0,00600$, Citrine-Leervektor/ Negativkontrolle: $0,0483 \pm 0,0075$; $n =$ mindestens 3 unabhängige Experimente (biologische Replikate); Einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test. (C) Vergleich der Bindungskurven der verschiedenen hTPC2-Varianten.

4.1.4 Die endogene Aktivität des hTPC2 in Endolysosomen humaner Fibroblasten

Im HEK-Zell-Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass die zwei polymorphen Varianten hTPC2-M484L und hTPC2-G734E die Kanalaktivität über unterschiedliche Mechanismen steigern können: eine vermehrte Aktivierung und eine verminderte Hemmung. Zur Überprüfung dieser Daten in humanen, endogen den hTPC2 exprimierenden Zellen wurde eine klinische Studie mit 136 blond- und braunhaarigen, europäischen Individuen durchgeführt mit dem Ziel geeignete Spender für Fibroblasten zu finden. Dabei wurde die genomische DNA (gDNA) aus Wangenschleimhautzellen unter Verwendung von Zytobürsten isoliert und sequenziert. Das humane TPCN2-Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus 25 Exons, die für das Protein codieren. Die Abschnitte von Exon 16 und Exon 25, in denen die SNPs M484L (rs35264875) und G734E (rs3829241) liegen (Abb. 20A), wurden mittels PCR amplifiziert. Bei der Sequenzierung der DNA eines diploiden Organismus ist das beobachtete Signal das Ergebnis beider Allele. Sind die beiden Allele an dem Genlocus gleich, erscheint ein einzelner Basen-Peak. Sind die beiden Allele an dem Genlocus verschieden, erscheint der Peak an der entsprechenden Position als gemischte Base. Im Rahmen der Studie konnten sowohl Individuen identifiziert werden, die homozygot für hTPC2-WT, homozygot für Leucin in Position 484 (HomL) oder homozygot für Glutaminsäure in Position 734 (HomE) waren, als auch solche, die heterozygot für die jeweiligen Polymorphismen waren (HetM/L, HetG/E, dHet) (Abb. 20B).

Die Analyse der Verteilung der Genotypen aller Individuen ergab, dass von allen dunkelhaarigen Studienteilnehmern 23,9% den Genotypen WT hatten, dagegen nur 2,9% den Genotypen HomL und 10,4% den Genotypen HomE. Von allen blondhaarigen Studienteilnehmern hatten jedoch nur 5,8% den Genotypen WT, dagegen hatten 7,2% den Genotypen HomL und 26,1% den Genotypen HomE (Abb. 20C).

Die Analyse der Verteilung der Phänotypen aller Individuen mit einem bestimmten Genotyp ergab, dass die Mehrheit der Individuen mit dem Genotyp homozygot WT dunkle Haare hatten (80%), wohingegen die Mehrheit der Individuen mit dem Genotyp HomL oder dem Genotyp HomE blonde Haare hatten (71,4% und 72%) (Abb. 20D). Somit sind die hier gezeigten Ergebnisse im Einklang mit den in *Nature Genetics* publizierten Daten (Sulem et al. 2008).

Zur Gewinnung von humanen Fibroblasten mit einer endogenen Expression des homozygoten hTPC2-WT oder der homozygoten hTPC2-Varianten (HomL oder HomE) wurde eine Hautbiopsie von je 4 Spendern entnommen.

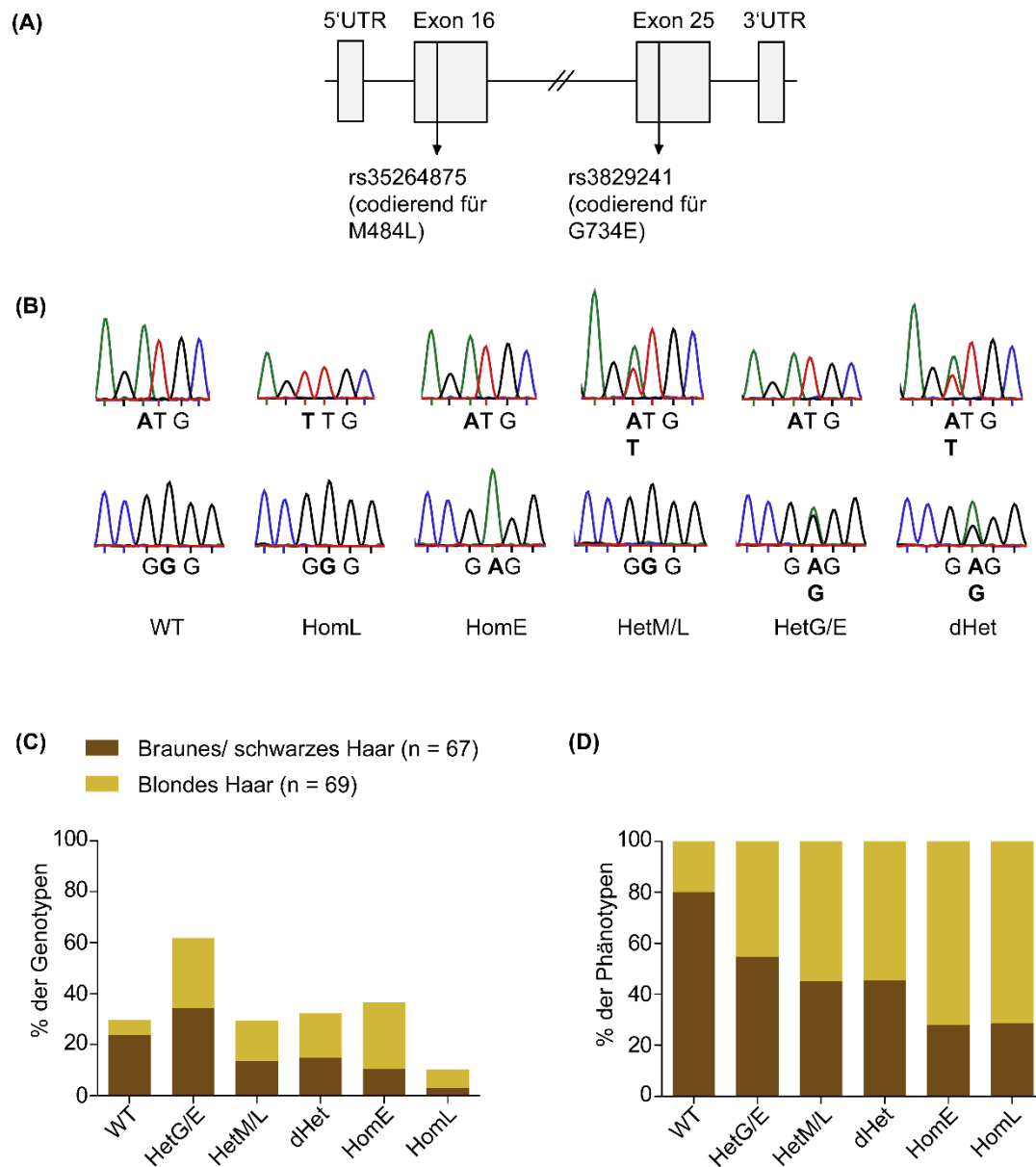


Abb. 20 SNP-Analyse humaner genomischer DNA, die entweder von blondhaarigen oder braun-/schwarzhaarigen Individuen isoliert wurde

(A) Diagramm der Lokalisation der Polymorphismen M484L und G734E im humanen TPCN2-Gen. (B) Exemplarische Elektropherogramme von Abschnitten der hTPCN2 gDNA. WT= Wildtyp, Het= heterozygot, Hom= Homozygot, dHet= doppelt heterozygot, GGG= Glycin (G), GAG= Glutaminsäure (E), ATG= Methionin (M), TTG= Leucin (L). (C) Verteilung der Genotypen aller Individuen mit entweder blonden oder braunen/ schwarzen Haaren. (D) Verteilung der Phänotypen aller Individuen mit einem bestimmten Genotyp.

In Endolysosomen von Fibroblasten, deren Spender den Genotypen WT oder HomE hatten, konnten nur geringe PI(3,5)P₂-aktivierte Ströme in Patch-Clamp-Experimenten gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigten Endolysosomen, deren Spender den Genotypen HomL hatten, eine signifikant erhöhte Kanalaktivität, sowohl basal (p-Wert= 0.02), als auch nach Aktivierung mit PI(3,5)P₂ (p-Wert= 0.00009). Als Aktivierungs-Kontrolle wurde der Mucolipin Transient Rezeptor Potential Kationenkanal-Aktivator ML-SA1 verwendet, der einen TRPML-vermittelten Ca²⁺-Einstrom aus Endolysosomen in das Zytoplasma bewirkt. Die TRPML-Kanal-Ströme waren nicht signifikant verschieden zwischen den Endolysosomen der verschiedenen Fibroblasten (p-Wert= 0,2) (Abb. 21).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die *in-vitro* beobachtete erhöhte Kanalaktivität der polymorphen Variante hTPC2-M484L auch in humanen Spenderzellen reproduzierbar ist.

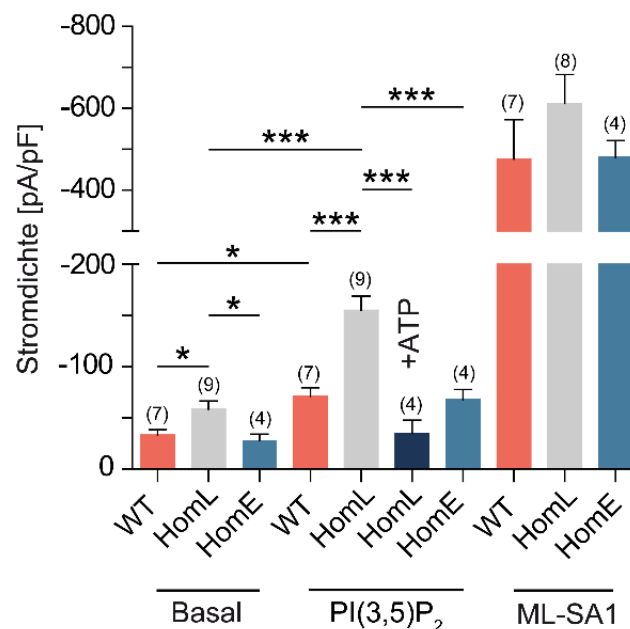


Abb. 21 Effekt von PI(3,5)P₂ auf Endolysosomen humaner Fibroblasten

Basale und PI(3,5)P₂-aktivierte Ströme wurden in Endolysosomen von Fibroblasten gemessen, deren Spender homozygot für hTPC2-WT, hTPC2-M484L oder hTPC2-G734E waren. Als Aktivierungskontrolle wurde ML-SA1 verwendet. Statistisch zusammengefasst wurde die durchschnittliche Stromdichte bei einer Spannung von -100 mV. Einfache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Tukey's Post-Test; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Die Patch-Clamp-Messungen wurden von Yu-Kai Chao durchgeführt.

4.2 Der Einfluss des mTPC2 auf die Entstehung einer Atherosklerose

4.2.1 Vergleich von TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen mit ApoE^{-/-} Kontrollmäusen

Zur Analyse des Einflusses des mTPCN2-Gens auf die Entwicklung einer Atherosklerose wurden mTPC2^{-/-} Mäuse mit ApoE-defizienten Mäusen gekreuzt. Beide Gene befinden sich bei Mäusen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (Position ApoE-Gen: 19.696109-19.699166, Position TPCN2-Gen: 145.253923-145.283927). Jedoch war die Entfernung der Allele auf dem Chromosom ausreichend groß, sodass ein Austausch der Genloci durch cross-over und eine erfolgreiche Generierung von ApoE^{-/-}TPC2^{-/-} Doppelknockout-Mäusen möglich war (Abstand ca.125 Millionen Basenpaare).

Sowohl Doppelknockout TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse als auch ApoE^{-/-} Kontrollmäuse wurden 34 Wochen lang mit einer normalen Standarddiät gefüttert. Anschließend wurden das Leber- und Körpergewicht, der Lipidgehalt des Plasmas sowie das Ausmaß der Plaquebildung analysiert. Der Vergleich der Lebergewichte (p-Wert= 0,416), ebenso wie der Vergleich des Verhältnisses von Leber- zu Körpergewicht (p-Wert= 0,621) ergaben keinen Unterschied. Jedoch hatten TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse ein höheres Körpergewicht (p-Wert= 0,0432) (Abb. 22A), wie es auch schon in einer früheren Studie bei älteren TPC-Knockout Mäusen beobachtet worden war (Lear et al. 2015).

Beide Gruppen zeigten ähnliche Plasma-Gesamttriglycerid- (TG) Konzentrationen (p-Wert= 0,895) (Abb. 22B). Dagegen hatten TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse eine größere Menge an Gesamtcholesterol im Plasma (p-Wert= 0,0227). Im Verhältnis zu Mäusen ohne ApoE-Hintergrund sind die Gesamtcholesterolkonzentrationen bei diesen Mäusen mit ApoE-Hintergrund um ein Vielfaches erhöht (Abb. 22C). Diese Werte entsprechen auch den Konzentrationen, die nach Literatur bei Mäusen auf Standarddiät zu erwarten sind (Pendse et al. 2009; Yin et al. 2012). Bei Doppelknockout Mäusen war die VLDL-Cholesterolkonzentration höher (p-Wert= 0,0048), die LDL-Cholesterolkonzentration gleich stark erhöht (p= 0,833) und die HDL-Cholesterolkonzentration geringer (p-Wert= 0,0046) im Vergleich zu ApoE^{-/-} Kontrollmäusen (Abb. 22D). Diese Veränderungen der Plasma-Lipidkonzentrationen können durch die beeinträchtigte Clearance der Lipoproteine durch die Leber aufgrund des Fehlens des ApoE-Gens beeinflusst worden sein und sind daher unabhängig vom Leberphänotyp TPC2-defizienter Mäuse.

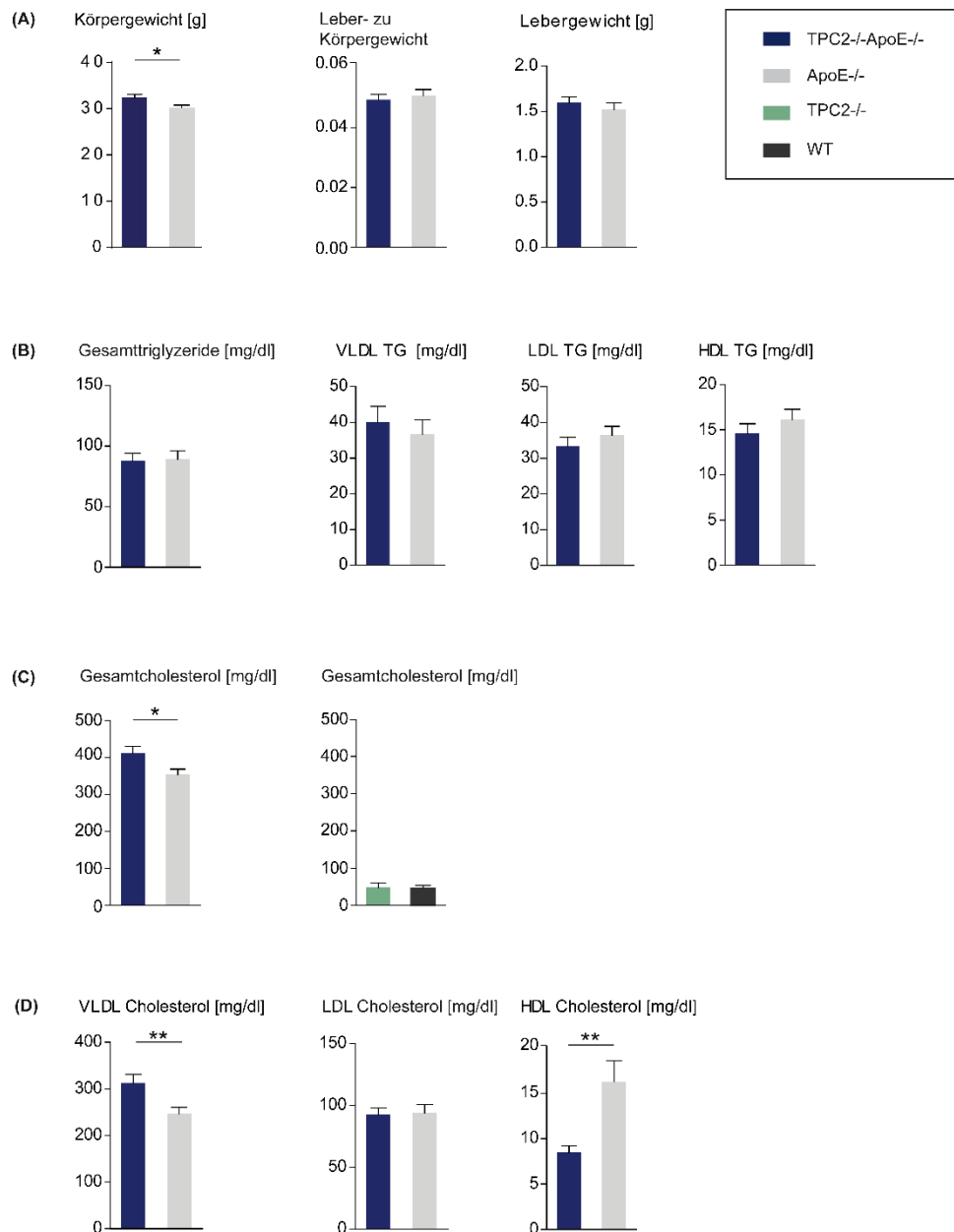


Abb. 22 Einfluss des Verlustes des mTPC2 auf Plasmalipidkonzentrationen und auf das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht

Vergleich von 34 Wochen alten TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (n= 11) mit ApoE^{-/-} Mäusen (n= 11).

(A) Das Körpergewicht [g]: (TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: 32,27± 0,789, ApoE^{-/-}: 30,24± 0,540), das Lebergewicht [g]: (TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: 1,59± 0,0656, ApoE^{-/-}: 1,52± 0,063) und das an das Körpergewicht angegliche Lebergewicht (TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: 0,0494± 0,00164, ApoE^{-/-}: 0,0507± 0,00204);

(B) Plasmatriglyceridkonzentrationen [mg/dl]: TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: Gesamt: 87,9± 6,28, VLDL: 40,0± 4,39, LDL: 33,3± 2,52, HDL: 14,6± 1,05; ApoE^{-/-}: Gesamt: 89,2± 6,83, VLDL: 36,7± 3,95, LDL: 36,4± 2,50, HDL: 16,1± 1,15 T-Test für unverbundene Stichproben; *p < 0.05, **p < 0.01.

(C) Plasma-Gesamtcholesterolkonzentrationen [mg/dl]: TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: 412± 18,1, ApoE^{-/-}: 354± 15,1. Zum Vergleich: TPC2^{-/-} (48,3± 12,8) und WT (46,9± 7,54) Mäuse ohne ApoE-Hintergrund (23 Wochen alt).

(D) Plasma-Lipoproteincholesterolkonzentrationen [mg/dl]: TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: LDL: 92,3± 5,58, VLDL: 311± 16,7, HDL: 8,46± 0,775; ApoE^{-/-}: LDL: 94,1± 6,54, VLDL: 244± 13,4, HDL: 16,3± 2,32.

Des Weiteren wurde überprüft, ob der Verlust des mTPC2 zu einer erhöhten Plaquebildung führt. Charakteristischerweise sind solche Stellen für atherosklerotische Läsionen anfällig, an denen die laminare Strömung des Blutes gestört ist. Dies ist beispielsweise an Gefäßverzweigungen der Fall. Mit Oil-Red-O können neutrale Lipide rot dargestellt werden. *En-face* Färbungen zeigten in den TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen deutliche Plaques entlang der thorakalen und abdominalen Aorta, wobei die stärkste Anhäufung von lipidreichen, atherosklerotischen Plaques im Bereich des Aortenbogens sichtbar wurde. Der restliche Bereich der thorakalen und abdominalen Aorta zeigte nur sporadisch auftretende Läsionen, die nicht an fest definierten Stellen auftraten (Abb. 23). Daher wurden für die Quantifizierung der atherosklerotischen Plaquelast der Bereich der Brachiocephalarterie und der Aortenwurzel gewählt.



Abb. 23 Verteilung der atherosklerotischen Plaques entlang der thorakalen und abdominalen Aorta
En-face Färbung der Aorta von TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen und ApoE^{-/-} Mäusen mit Öl-Rot-O. Das fettreiche Plaquegewebe ist rot dargestellt.

Die Größe der atherosklerotischen Plaques ist ein wichtiger Faktor zur Bestimmung der Progression der Atherosklerose *in-vivo*. Die Gefrierschnitte wurden mit Oil-Red-O gefärbt, ähnlich der Methode für die gesamte Aorta (Abb. 24A). Die Fläche der atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel war signifikant größer bei TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Doppelknockout-Mäusen in Vergleich zu ApoE^{-/-} Kontrollmäusen (p-Wert=0,0143). Bei der Quantifizierung der Querschnittsfläche der atherosklerotischen Läsionen der Brachiocephalarterie zeigte sich in TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Doppelknockout-Mäusen keine unterschiedliche Ausdehnung der Plaques (p-Wert= 0,451) (Abb. 24B).

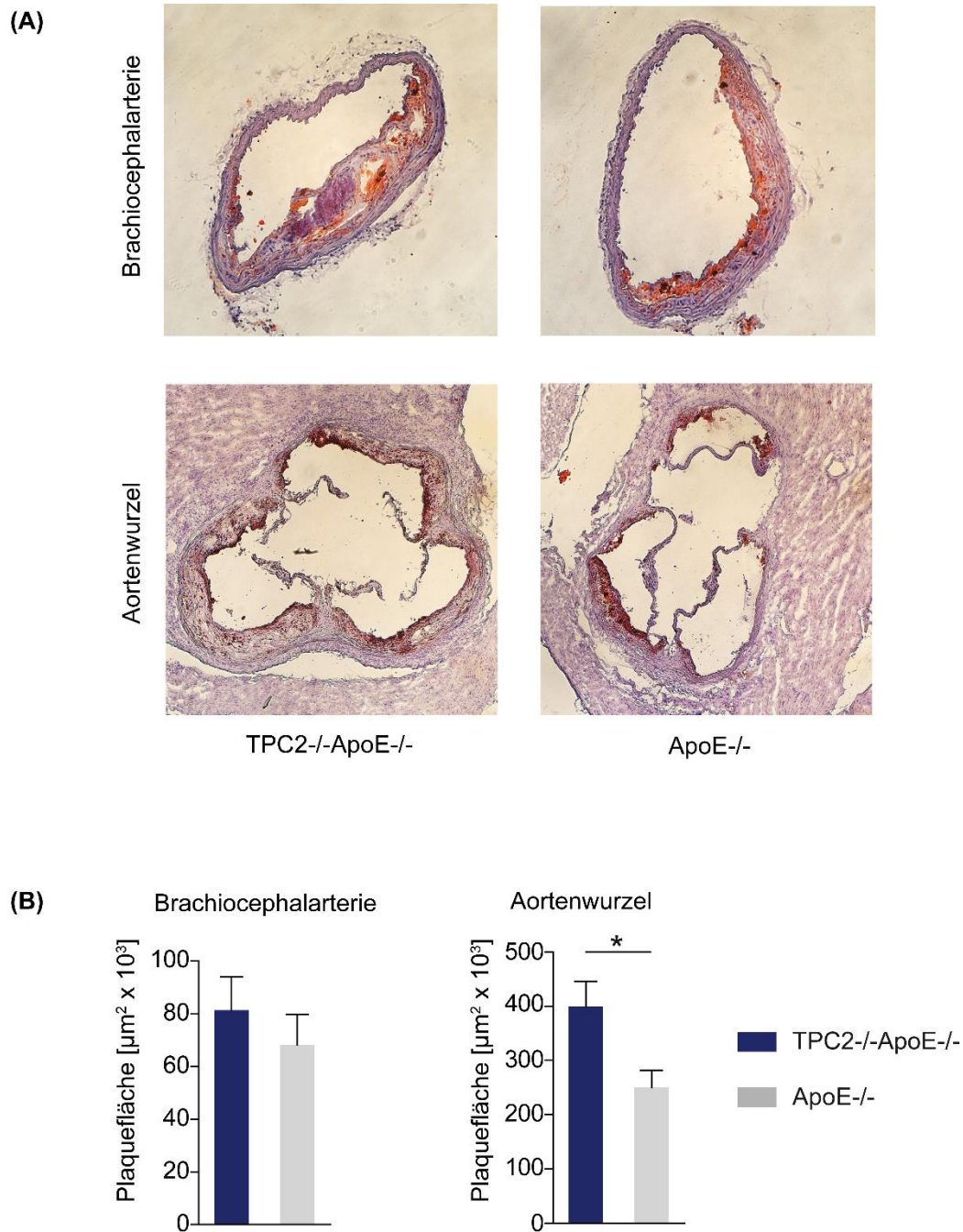


Abb. 24 Einfluss des Verlustes des mTPC2 auf die Bildung von atherosklerotischen Plaques

Vergleich von 34 Wochen alten TPC2^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (n= 9) mit ApoE^{-/-} Mäusen (n= 11). (A) Mit Öl-Rot-O und Haematoxylin gefärbte Kryoschnitte der Brachiocephalarterie und der Aortenwurzel. (B) Quantifizierung der atherosklerotischen Plaquelast der Brachiocephalarterie (in [$\mu\text{m}^2/10^3$]: TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: 81,4± 12,6; ApoE^{-/-}: 68,2± 11,7) und der Aortenwurzel (in [$\mu\text{m}^2/10^3$]: TPC2^{-/-}ApoE^{-/-}: 400± 46,4; ApoE^{-/-}: 250± 32,4). T-Test für unverbundene Stichproben; *p< 0.05.

Somit konnte bei diesem Atherosklerose-Mausmodell gezeigt werden, dass der Verlust der mTPC2-Aktivität sich in einer tendenziell erhöhten atherosklerotischen Plaquelast äußert.

4.2.2 Vergleich von TPC2^{-/-} Mäusen mit TPC2-WT Mäusen nach Fütterung mit einer fettreichen Diät

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss des mTPC2 auf die Entwicklung einer Atherosklerose zu analysieren, war die Messung der Konzentrationen von Lipoproteinpartikeln im Plasma und deren Verteilung in Partikel-Subpopulationen nach nahrungsinduzierter Hypercholesterinämie.

Bei einem Teil der Herzinfarktpatienten finden sich nur mäßig erhöhte oder sogar unauffällige LDL-Cholesterinwerte, da die Größenverteilung der Lipoproteinpartikel einen entscheidenden Einfluss auf das Atherosklerose-Risiko hat (Caulfield et al. 2008). Die Basis für die Einteilung der LDL-Lipoproteine in 7 verschiedene Subpopulationen von LDL I bis LDL IV stellen Charakteristika wie die Dichte, Größe und der Anteil ihrer Bestandteile dar. Besonders kleine, dichte LDL-Partikel (Fraktionen III und IV) besitzen pathophysiologisch ein sehr hohes atherogenes Potential (Berneis and Krauss 2002).

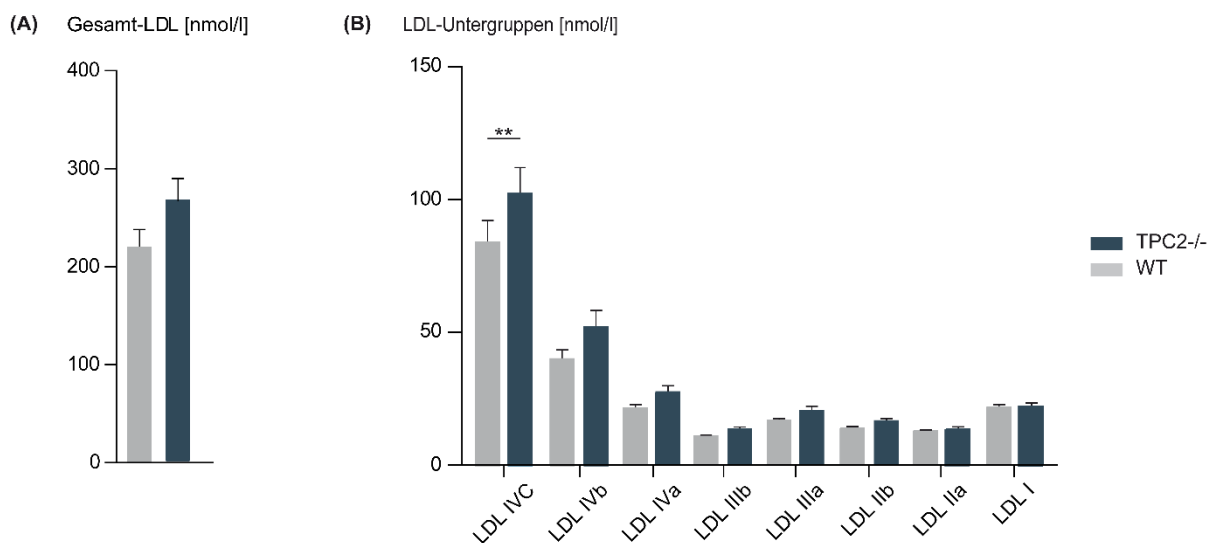


Abb. 25 Einfluss des Verlustes des mTPC2 auf die Verteilung der LDL-Partikel in den verschiedenen Subpopulationen

Vergleich von TPC2^{-/-} Mäusen (n= 8) mit TPC2-WT (n= 9) Mäusen nach Fütterung mit einer fettreichen Diät für 6 Wochen (A) Gesamt-LDL-Konzentrationen [nmol/l]: WT: 219± 17,1; TPC2^{-/-}: 266± 22,7 (B) Statistisch zusammengefasst wurden die Konzentration der LDL-Untergruppen; LDL I: 219.9–238 Å, LDL II, 211–219.9 Å, LDL III, 201.7–211 Å, LDL IV, 180–201.7 Å (Caulfield et al. 2008). Zweifache Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Bonferroni's Post-hoc-Test; **p < 0.01. T-Test für unverbundene Stichproben.

Um zu untersuchen, ob mTPC2^{-/-} Mäuse ein atherogenes Lipidprofil haben, wurden TPC2^{-/-} und TPC2-WT Mäuse ohne ApoE-Hintergrund für 6 Wochen mit einer fettreichen Diät gefüttert. Die detaillierte Plasmalipoprotein-Analyse mittels Ionenmobilitätsanalyse verdeutlichte, dass TPC2^{-/-} Mäuse trotz ähnlicher LDL-Gesamtkonzentrationen (p-Wert= 0,119) eine Tendenz zu erhöhten Konzentrationen an kleinen, dichten LDL-Partikeln aufweisen (Fraktionen III und IV), wobei die Fraktion IVC einen signifikanten Unterschied zeigte (p-Wert< 0,01) (Abb. 25). In dieser Fraktion lag die LDL-Konzentration bei den TPC2-WT Mäusen bei $83,6 \pm 8,57$ [nmol/l], bei den TPC2^{-/-} Mäusen dagegen bei $102 \pm 9,87$ [nmol/l]. Diese kleinen, dichten LDL-Partikel stellen wesentliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose dar, da sie leichter das Endothel penetrieren und stärker an arterielle Proteoglykane binden können. Zudem besitzen sie eine geringere Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Berneis and Krauss 2002). Somit konnte belegt werden, dass mTPC2^{-/-} Mäuse veränderte Konzentrationen an LDL-Subpopulationen haben, die möglicherweise die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigen können.

5 Diskussion

5.1 Die mit blonder Haarfarbe korrelierenden hTPC2-Varianten zeigen eine erhöhte Kanalaktivität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden polymorphen Varianten hTPC2-M484L und hTPC2-G734E die Aktivität des Ionenkanals durch verschiedene Mechanismen steigern (Gain of Function, GOF): eine verstärkte Aktivierung und eine verminderte Inaktivierung.

5.1.1 Steigerung der hTPC2-Aktivität aufgrund des M484L Polymorphismus

Bei der polymorphen Variante hTPC2-M484L konnte eine gesteigerte Kanalaktivität (GOF) aufgrund einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem endogenen Aktivator PI(3,5)P₂ nachgewiesen werden.

Sowohl im HEK-Zellexpressionssystem als auch endogen in humanen Fibroblasten zeigte sich eine erhöhte Kanalaktivität der polymorphen hTPC2-M484L Variante, sowohl basal, als auch nach Aktivierung mit PI(3,5)P₂. Die Dosis-Wirkungskurven der hTPC2-M484L Variante wiesen einen erhöhten maximalen Wert und eine erniedrigte halbmaximale Aktivierungskonzentration für PI(3,5)P₂ auf. Die Folge des Vorhandenseins des M484L Polymorphismus ist somit eine höhere intrinsische Aktivität (efficacy) und Wirkstärke (potency) von PI(3,5)P₂. Bei Verwendung der PI(3,5)P₂-EC50-Konzentration des hTPC2-WT hat die hTPC2-M484L Variante bereits fast ihr Aktivierungsplateau erreicht (Abb. 26A).

Ionenkanäle können 3 Funktionszustände bzw. Konformationen annehmen: offen, geschlossen, inaktiv. In Abwesenheit des Aktivators PI(3,5)P₂ öffnet sich der TPC2 selten, das Gleichgewicht ist zu einer erhöhten Anzahl geschlossener Kanäle verschoben. Die Bindung von PI(3,5)P₂ bewirkt eine Verlagerung des Gleichgewichts von der geschlossenen zur offenen Konformation. Der M484L Polymorphismus ermöglicht PI(3,5)P₂ eine Stabilisierung des Kanals in der offenen Konformation (Abb. 26B). Wie durch Molecular Modeling und Ionen-Substitutions-Experimente gezeigt werden konnte, führt der M484L Polymorphismus zudem zu strukturellen Veränderungen, die eine Erweiterung des Porendurchmessers bewirken (Chao et al. 2017). Die Konsequenz ist eine erhöhte Menge an Ionen, die pro Zeiteinheit in das Zytosol transportiert werden (Abb. 26C).

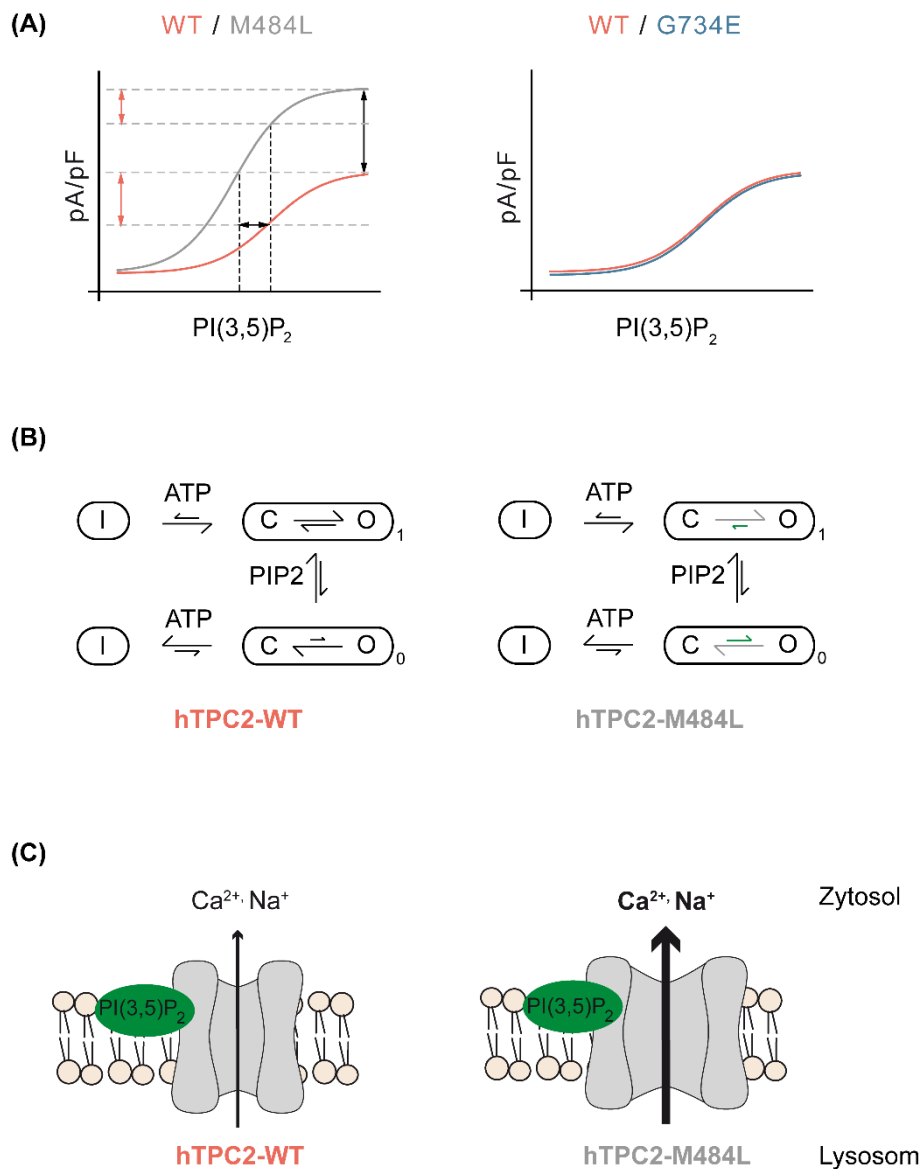


Abb. 26 Einfluss des M484L Polymorphismus auf das Schaltverhalten des TPC2

(A) Schematische PI(3,5)P₂ Dosis-Wirkungskurven von hTPC2-WT versus hTPC2-M484L (links) und hTPC2-WT versus hTPC2-G734E (rechts). Die gestrichelten Linien und roten Doppelpfeile zeigen den Bereich der weiteren Steigerung der hTPC2-M484L-Aktivität bei Verwendung von PI(3,5)P₂-EC₅₀-Konzentrationen des hTPC2-WT an.

(B) Zustandsmodell des Schaltverhaltens (gating) des hTPC2-WT und der hTPC2-M484L Variante; O= offen, C= geschlossen, I= inaktiv.

(C) Modell der Beeinflussung der Kanalaktivität.

Der M484L Polymorphismus liegt im Transmembransegment IIS2 in der dem Zytosol zugewandten Seite. Dabei wurde das hydrophilere Methionin durch die lipophilere Aminosäure Leucin ersetzt. Durch den Polymorphismus könnte zum einen direkt die Bindung von $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ (oder von $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ rekrutierter Regulatoren) an den Kanal beeinflusst werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der M484L Polymorphismus eine Konformationsänderung initiiert, die allosterisch an einer anderen, noch unbekannten Stelle des TPC2 die $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ -Bindung verändert.

Interessanterweise zeigen Mäuse mit Mutationen im Fig4-Gen, das bei der Regulation der $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ -Konzentration eine Rolle spielt, eine Hypopigmentation (Marks 2008).

Ob die Sensitivität gegenüber dem konventionellen TPC2-Agonisten NAADP durch die SNPs beeinflusst wird, müssen künftige Studien zeigen.

5.1.2 Steigerung der hTPC2-Aktivität aufgrund des G734E Polymorphismus

Zudem konnte in dieser Arbeit bei der polymorphen Variante hTPC2-G734E eine gesteigerte Kanalaktivität (GOF) aufgrund einer verringerten Sensitivität gegenüber den Inhibitoren ATP/ mTOR nachgewiesen werden.

Im Vergleich mit dem hTPC2-WT ist bei der hTPC2-G734E Variante die Dosis-Wirkungs-Kurve für ATP verändert. Unter Verwendung der gleichen ATP-Konzentration kann der hTPC2-G734E schwerer durch ATP geblockt werden (Abb. 27A).

Die ATP-Bindung an mTOR fördert die Kanal-Inaktivierung in einem zweistufigen Prozess: Zuerst assoziiert mTOR mit dem hTPC2. Die darauffolgende Ladungsänderung (aufgrund der Phosphorylierung) und Konformationsänderung äußert sich in einer Inaktivierung. Eine Abschwächung des Effekts von ATP/ mTOR durch den G734E Polymorphismus führt daher zu einem verringerten Übergang des Kanals in einen inaktiven Zustand (Abb. 27B). Dies erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des hTPC2 ohne den Aktivierungsprozess an sich zu beeinflussen (Abb. 27C).

Der G734E Polymorphismus befindet sich im zytosolisch gelegenen C-Terminus des hTPC2. Durch den Austausch der kleinsten Aminosäure Glycin durch die größere und polare Aminosäure Glutaminsäure wird möglicherweise die Bindung der Kinase mTOR an den Kanal beeinflusst. Bei der Interaktion zwischen den hTPC2-Varianten und mTOR kann es sich auch um einen dynamischen Prozess handeln. Vorübergehende und schnell ablaufende Wechselwirkungen werden bei statischen FRET-Messungen oftmals unterbewertet.

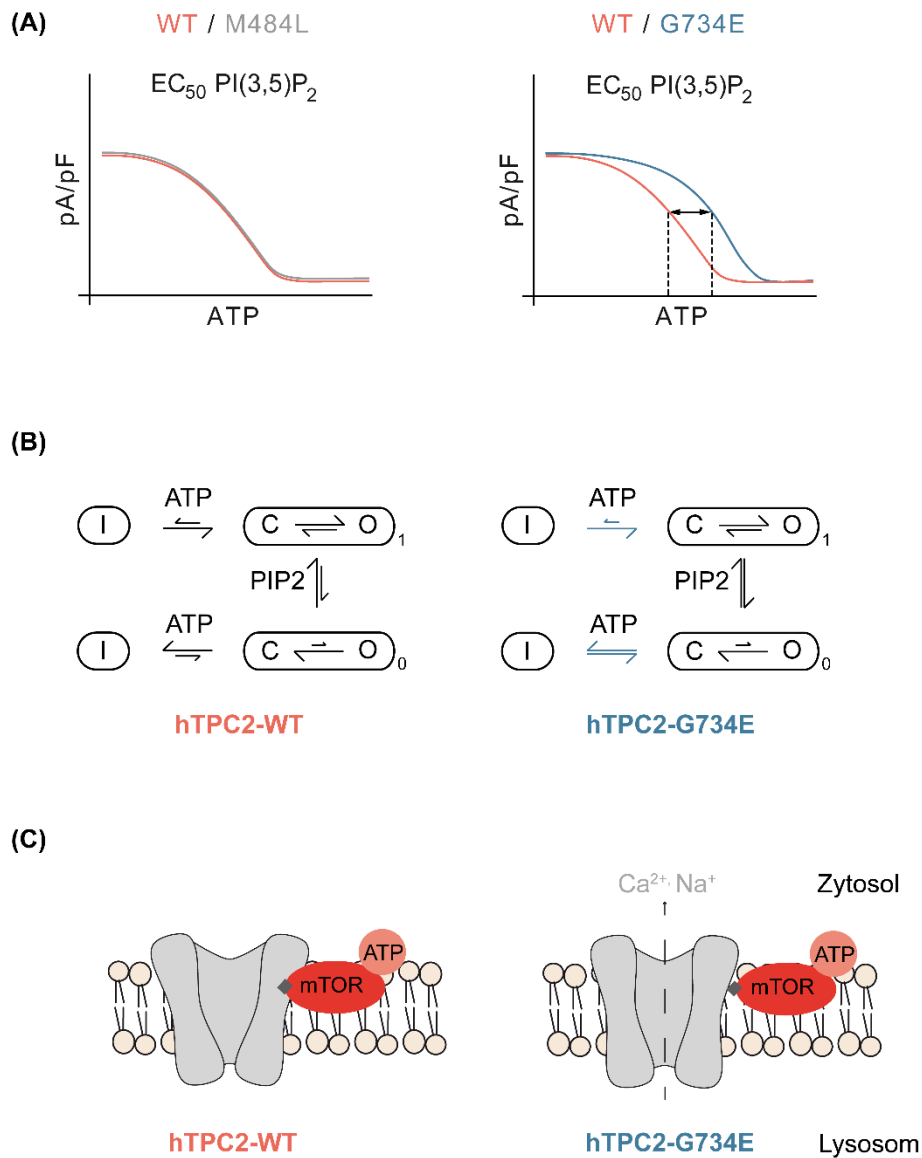


Abb. 27 Einfluss des G734E Polymorphismus auf das Schaltverhalten des TPC2

(A) Schematische ATP Dosis-Wirkungskurven von hTPC2-WT versus hTPC2-M484L (links) und hTPC2-WT versus hTPC2-G734E (rechts) unter Verwendung der jeweiligen $PI(3,5)P_2$ - EC_{50} -Konzentrationen zur Aktivierung des Kanals. (B) Zustandsmodell des Schaltverhaltens (gating) des hTPC2-WT und der hTPC2-G734E Variante; O= offen, C= geschlossen, I= inaktiv. (C) Modell der Beeinflussung der Kanalaktivität.

5.1.3 Physiologische Konsequenzen einer veränderten hTPC2-Aktivität

Die Tyrosinase ist ein pH-abhängiges Enzym, das eine Schlüsselrolle bei der Melanin-Produktion spielt und daher wesentlich zur Generierung der Haarfarbe beiträgt (Bin et al. 2015; Ito et al. 2013). Zur Aufrechterhaltung eines neutralen pH-Wertes wird die korrekte Funktion verschiedener Kanäle und Transporter benötigt. Polymorphismen, die mit einer veränderten Kanalfunktion einhergehen, können somit die Melanin-Produktion beeinflussen (Kondo and Hearing 2011; Ito and Wakamatsu 2011).

Der hTPC2-WT depolarisiert die melanosomale Membran und erhöht die Na^+ -Konzentration in der Nähe der v-ATPase, die dadurch ihre Aktivität steigert und Protonen in das melanosomale Lumen pumpt (Abb. 28A) (Bellono, Escobar, and Oancea 2016). Die TPC2-vermittelte pH-Regulation könnte auch Teil eines komplexeren Mechanismus sein, an dem weitere Kanäle und Transporter beteiligt sind.

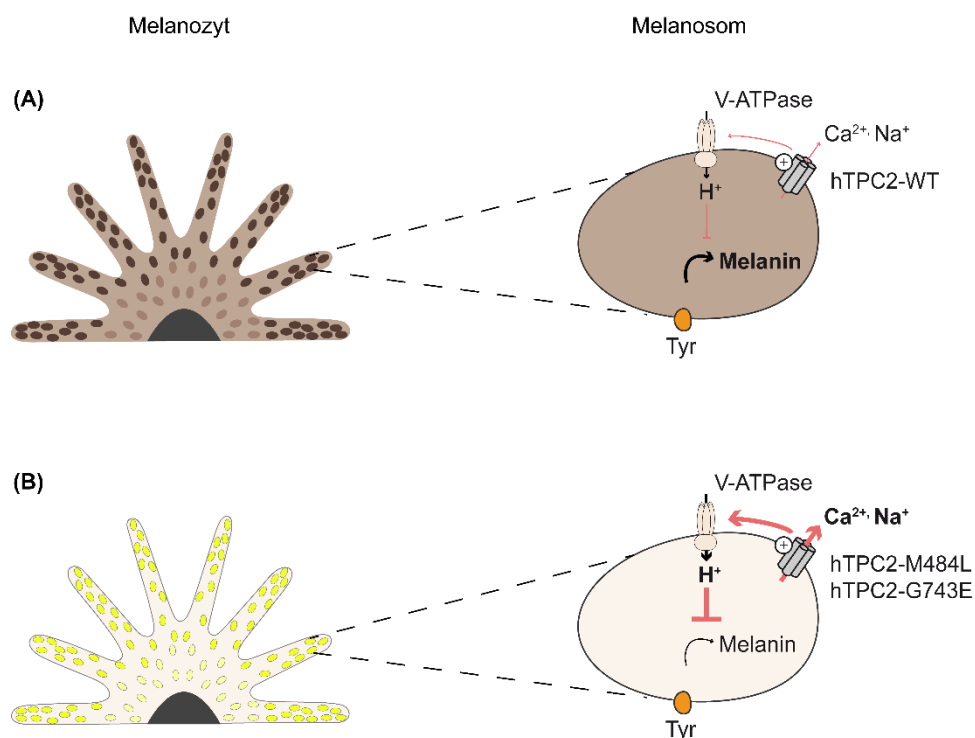


Abb. 28 Die Funktion des TPC2 in Melanosomen (von Melanozyten)

(A) Modell der Regulation des melanosomalen pH-Werts und der Melanogenese durch den hTPC2-WT.

(B) Einfluss der durch die Polymorphismen veränderten TPC2-Aktivität auf die Melanogenese.

Tyr= Tyrosinase

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, den fehlenden Mechanismus aufzuzeigen, der die Assoziation zwischen dem TPC2-Gen und seinem Phänotypen erklären kann: Die Verschiebung von brauner zu blonder Haarfarbe ist durch eine veränderte Proteinfunktion bedingt. Sowohl die durch den Polymorphismus M484L beeinflusste Sensitivität gegenüber dem Aktivator $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ als auch die durch den Polymorphismus G734E beeinflusste Sensitivität gegenüber den Inhibitoren ATP/ mTOR zeigt sich in einer Steigerung der Kanalfunktion (GOF). Eine mögliche Konsequenz des Anstiegs des Membranpotentials ist eine Erhöhung der Pumpleistung der V-ATPase, welche mit einer Reduktion der Melanin-Produktion und einer helleren Haarfarbe einhergeht (Abb. 28B).

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit den Studien von (Ambrosio et al. 2016), in der mit humanen Zelllinien gearbeitet wurde, und der Studie von (Bellono, Escobar, and Oancea 2016), in der murine Melanozyten verwendet wurden. Diese Arbeiten zeigten einen erhöhten Melanin-Gehalt in TPC2-defizienten Zellen und eine reduzierte Pigmentbildung infolge einer TPC2-Überexpression. Damit übereinstimmend geht eine Überexpression des hTPC2 mit einer verminderten Pigmentierung in der animalen Hälfte der Eizellen von *Xenopus laevis* einher (Lin-Moshier et al. 2014).

Zudem sind die Daten meiner klinischen Studie mit europäischen Probanden im Einklang mit der genomweiten Assoziationsstudie von (Sulem et al. 2008), welche mit niederländischen und isländischen Individuen durchgeführt wurde: Individuen, die die Varianten hTPC2-M484L oder hTPC2-G734E exprimieren, haben eher blonde als braune Haare.

Des Weiteren stellt diese Studie eine Basis für zukünftige Arbeiten dar, die molekulare Mechanismen untersuchen, denen durch Ionen vermittelte Signalwege zugrunde liegen. Von Bedeutung sind Konsequenzen der veränderten TPC2-Aktivität auf die Entstehung und Progression von Krankheiten und auf den Gesundheitszustand. Zukünftige Studien müssen zeigen, inwiefern die zwei Varianten weitere physiologische Funktionen des TPC2 wie Trafficking-Prozesse (EGF, PDGFR, LDL-Cholesterol), die Anfälligkeit für bestimmte virale Infektionen oder die Entstehung einer Fettleber und die Ausdauer unter Fasten-Bedingungen beeinflussen.

5.2 Erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Atherosklerose durch den Verlust der mTPC2-Aktivität

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TPC2 eine wichtige Rolle bei der Lipidhomöostase spielt und sich bei einem Verlust der TPC2-Aktivität eine Tendenz zur Atherosklerose-Entwicklung zeigt.

Das Fehlen des TPCN2-Gens führt in ApoE^{-/-} Mäusen neben einem erhöhten Körpergewicht zu einer leicht vergrößerten Plaquefläche. Die beobachtete Dyslipidämie kann in ApoE-defizienten Mäusen durch eine Reduktion der Clearance der Lipoproteine durch die Leber beeinflusst worden sein. In Mäusen ohne ApoE-Hintergrund führt der Verlust des TPCN2-Gens dagegen zu einer verstärkten Bildung von sehr kleinen, dichten und damit besonders atherogenen LDL-Partikeln.

Endolysosomale TPC2s sind in verschiedenen Zelltypen wie beispielsweise in Makrophagen, Fibroblasten (Cang et al. 2013), in glatten Muskelzellen (Jiang et al. 2013; Pereira et al. 2014), Endothelzellen (Favia et al. 2014), aber auch in zytotoxischen T-Zellen (Davis et al. 2012) zu finden. (Jiang et al. 2013) wies bereits die Expression von TPC2 mRNAs und Proteinen in den Aorten von Ratten nach. Von Bedeutung für künftige Studien ist die genaue Expression und Funktion des TPC2 in den verschiedenen Zellpopulationen der Aorta.

In Makrophagen oder in der Subpopulation der Makrophagen-ähnlichen glatten Muskelzellen wären verschiedene Mechanismen denkbar, die für den TPC2-Phänotypen verantwortlich sein könnten. Zum einen könnte ein TPC2-Knockout zu einer teilweisen Blockade des Transports oder Abbaus und einer Akkumulation von LDL-Cholesterol und Cholesterolestern in späten Endosomen führen. Diese könnten sich nach Verlassen des endolysosomalen Systems in einer vermehrten Lipid-Akkumulation in Form von Lipidtropfen äußern. Ein reduzierter Abtransport an freiem Cholesterol aus den Lysosomen könnte dagegen die Cholesterol-Ausscheidung verringern und zu einer Bildung von Cholesterol-Kristallen führen. Deren Freisetzung ins Zytosol kann eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Abb. 29).

Systemisch könnte sich eine solche Dysregulation des Lipidmetabolismus in einer verstärkten Bildung von instabilen, atherosklerotischen Plaques aufgrund einer vermehrten Rekrutierung von Monozyten/ Makrophagen, einer höheren Anzahl an Schaumzellen, eines vergrößerten nekrotischen Kerns (durch eine vermehrte Apoptose und Lipidfreisetzung von Makrophagen) und einer verstärkten Akkumulation von Cholesterol-Kristallen äußern.

Kürzlich wurde gezeigt, dass das Fehlen des CD38-Gens in Mäusen und damit der Verlust des CD38/ NAADP-Signalwegs zu einer lysosomalen Cholesterol-Akkumulation in Makrophagen und zu atherosklerotischen Veränderungen der Koronararterien führt. Auch bei Wildtyp-Makrophagen, die mit dem NAADP-Antagonist Ned-19 behandelt wurden, waren vermehrt Lipidablagerung in den Lysosomen erkennbar. In dieser Studie wird spekuliert, dass

eine verringerte Ca^{2+} -Freisetzung einen verringerten Cholesterol-Ausstrom aus den Lysosomen zur Folge hat (Xu et al. 2016). Inwiefern der Verlust des TPC2-Gens zu einer verminderten Freisetzungsrates an freiem Cholesterol aus den Endolysosomen und zu einer geringeren Abgabe an ApoA1 führt, müssen künftige Studien zeigen.

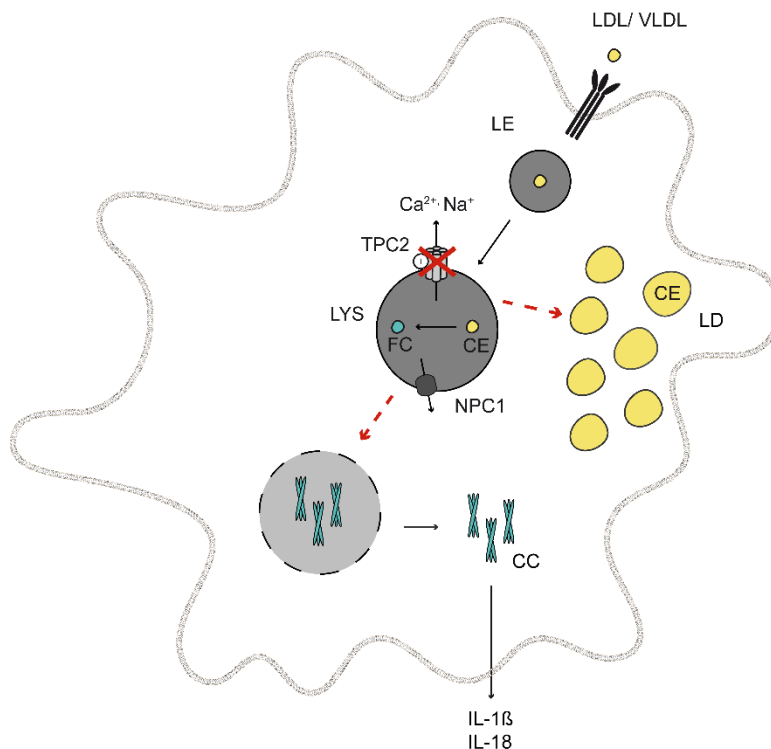


Abb. 29 Die Funktion des TPC2 in Lysosomen (von Makrophagen)

Der TPC2 beeinflusst möglicherweise den Lipidmetabolismus.

LDL= Lipoprotein geringer Dichte, VLDL= Lipoprotein sehr geringer Dichte, LE= spätes Endosom, CE= Cholesterolester, FC= freie Fettsäure, LYS= Lysosom, NPC1= Niemann-Pick Typ C1, LD= Lipidtropfen, CC= Cholesterolkristalle, IL= Interleukin

Bei allen atherosklerotischen Untersuchungen spielt auch der genetische Hintergrund der Mauslinien eine entscheidende Rolle. Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J sind besonders anfällig für die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques. Das Ausmaß der Atherosklerose bei ApoE^{-/-} Mäusen mit einem C57BL/6J Hintergrund ist siebenfach erhöht im Vergleich zu Mäusen mit einem FVB Hintergrund (Xu 2004). Ein BALB Hintergrund lässt eher Plaque-Komplikationen zu (Welch et al. 2007). Die im Rahmen dieser Studie verwendeten ApoE^{-/-} Kontroll-Mäuse hatten einen reineren C57BL/6J Hintergrund als die TPC2^{-/-}-ApoE^{-/-} Mäuse, was den möglichen Einfluss des Verlusts des TPC2-Gens auf die Entwicklung einer Atherosklerose noch bekräftigt.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die wichtige physiologische Funktion des TPC2 sowohl in Lysosomen als auch in mit Lysosomen verwandten Organellen, den Melanosomen.

In einer genomweiten Assoziationsstudie wurden zwei Polymorphismen des humanen TPC2 gefunden, die mit blonder Haarfarbe korrelieren. Drei weitere Studien bestätigten den Einfluss des TPC2 auf Pigmentierungsprozesse. Jedoch wurden diese Polymorphismen bis jetzt noch nicht funktionell charakterisiert.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die verschiedenen hTPC2-Varianten im HEK-Zell-Expressionssystem vergleichbare Eigenschaften im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation, den Vacuolin-Effekt, das Expressionslevel und die Dimerisierungs-Effizienz aufweisen. Doch die Aktivität des Ionenkanals können beide Varianten hTPC2-M484L und hTPC2-G734E durch verschiedene Mechanismen steigern (Gain of function, GOF).

Bei der polymorphen Variante hTPC2-M484L konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem endogenen Aktivator $PI(3,5)P_2$ nachgewiesen werden. Die Dosis-Wirkungskurven der hTPC2-M484L Variante wiesen einen erhöhten maximalen Wert und eine erniedrigte halbmaximale Aktivierungskonzentration für $PI(3,5)P_2$ auf. Die Folge des Vorhandenseins des M484L Polymorphismus ist somit eine höhere intrinsische Aktivität (efficacy) und Wirkstärke (potency) von $PI(3,5)P_2$ und eine Erweiterung des Durchmessers der Kanalpore.

Bei der polymorphen Variante hTPC2-G734E konnte eine verringerte Sensitivität gegenüber den Inhibitoren ATP/ mTOR nachgewiesen werden. Der Polymorphismus erhöht die Resistenz gegenüber einer Blockade durch ATP/ mTOR und kann zu einem verringerten Übergang des Kanals in einen inaktiven Zustand und damit zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit führen.

In einer klinischen Studie mit 136 blond- und braunhaarigen, europäischen Individuen konnte die Korrelation der polymorphen hTPC2-Varianten mit blonder Haarfarbe bestätigt werden. Zudem war auch in Endolysosomen von Fibroblasten, deren Spender den Genotypen HomL hatten, eine erhöhte Stromdichte nachweisbar.

Die resultierende Ansäuerung der Melanosomen kann zur Inhibierung der Tyrosinase und zu einer reduzierten Melanin-Produktion führen. Die Konsequenz ist ein bevorzugtes Auftreten blonder Haare.

Somit ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, den fehlenden Mechanismus aufzuzeigen, der die Assoziation zwischen dem TPCN2-Gen und seinem Phänotypen erklären kann.

Frühere Arbeiten lieferten Hinweise, dass der TPC2 für endolysosomale Transportprozesse und die Lipid-Homöostase von Bedeutung ist. Das Fehlen des TPC2 zeigte sich in MEF-Zellen in einer Cholesterol-Akkumulation, in Mäusen in einer Anreicherung von Fett-Vakuolen in der Leber oder auch einer Adipositas.

Diese Arbeit bestätigt den Einfluss des mTPC2 auf die Lipid-Homöostase und zeigt erstmals, dass der Verlust der TPC2-Aktivität sich in einer Tendenz zur Atherosklerose-Entwicklung äußert. Das Fehlen des TPCN2-Gens führte in ApoE^{-/-} Mäusen neben einem erhöhten Körpergewicht zu einer leicht vergrößerten Plaquefläche. Die beobachtete Dyslipidämie kann in ApoE-defizienten Mäusen durch eine Reduktion der Clearance der Lipoproteine durch die Leber beeinflusst worden sein. In Mäusen ohne ApoE-Hintergrund führt der Verlust des TPCN2-Gens dagegen zu einer verstärkten Bildung von sehr kleinen, dichten und damit besonders atherogenen LDL-Partikeln.

Referenzen

- Aarhus, R., R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseth, and H. C. Lee. 1995. 'ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP', *J Biol Chem*, 270: 30327-33.
- Aley, P. K., A. M. Mikolajczyk, B. Munz, G. C. Churchill, A. Galione, and F. Berger. 2010. 'Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate regulates skeletal muscle differentiation via action at two-pore channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 19927-32.
- Ambrosio, A. L., J. A. Boyle, A. E. Aradi, K. A. Christian, and S. M. Di Pietro. 2016. 'TPC2 controls pigmentation by regulating melanosome pH and size', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 5622-7.
- Andres-Manzano, M. J., V. Andres, and B. Dorado. 2015. 'Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root', *Methods Mol Biol*, 1339: 85-99.
- Arredouani, A., M. Ruas, S. C. Collins, R. Parkesh, F. Clough, T. Pillinger, G. Coltart, K. Rietdorf, A. Royle, P. Johnson, M. Braun, Q. Zhang, W. Sones, K. Shimomura, A. J. Morgan, A. M. Lewis, K. T. Chuang, R. Tunn, J. Gadea, L. Teboul, P. M. Heister, P. W. Tynan, E. A. Bellomo, G. A. Rutter, P. Rorsman, G. C. Churchill, J. Parrington, and A. Galione. 2015. 'Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) and Endolysosomal Two-pore Channels Modulate Membrane Excitability and Stimulus-Secretion Coupling in Mouse Pancreatic beta Cells', *J Biol Chem*, 290: 21376-92.
- Barsh, G., and G. Cotsarelis. 2007. 'How hair gets its pigment', *Cell*, 130: 779-81.
- Bellono, N. W., I. E. Escobar, A. J. Lefkovith, M. S. Marks, and E. Oancea. 2014. 'An intracellular anion channel critical for pigmentation', *Elife*, 3: e04543.
- Bellono, N. W., I. E. Escobar, and E. Oancea. 2016. 'A melanosomal two-pore sodium channel regulates pigmentation', *Sci Rep*, 6: 26570.
- Bellono, N. W., and E. V. Oancea. 2014. 'Ion transport in pigmentation', *Arch Biochem Biophys*, 563: 35-41.
- Berneis, K. K., and R. M. Krauss. 2002. 'Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity', *J Lipid Res*, 43: 1363-79.
- Betz, C., and M. N. Hall. 2013. 'Where is mTOR and what is it doing there?', *J Cell Biol*, 203: 563-74.
- Bin, B. H., J. Bhin, S. H. Yang, M. Shin, Y. J. Nam, D. H. Choi, D. W. Shin, A. Y. Lee, D. Hwang, E. G. Cho, and T. R. Lee. 2015. 'Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity', *PLoS One*, 10: e0129273.
- Brailoiu, E., R. Hooper, X. Cai, G. C. Brailoiu, M. V. Keebler, N. J. Dun, J. S. Marchant, and S. Patel. 2010. 'An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles', *J Biol Chem*, 285: 2897-901.
- Brailoiu, E., T. Rahman, D. Churamani, D. L. Prole, G. C. Brailoiu, R. Hooper, C. W. Taylor, and S. Patel. 2010. 'An NAADP-gated two-pore channel targeted to the plasma membrane uncouples triggering from amplifying Ca²⁺ signals', *J Biol Chem*, 285: 38511-6.
- Butz, E. S., M. Ben-Johny, M. Shen, P. S. Yang, L. Sang, M. Biel, D. T. Yue, and C. Wahl-Schott. 2016. 'Quantifying macromolecular interactions in living cells using FRET two-hybrid assays', *Nat Protoc*, 11: 2470-98.
- Cane, M. C., J. Parrington, P. Rorsman, A. Galione, and G. A. Rutter. 2016. 'The two pore channel TPC2 is dispensable in pancreatic beta-cells for normal Ca²⁺(+) dynamics and insulin secretion', *Cell Calcium*, 59: 32-40.
- Cang, C., Y. Zhou, B. Navarro, Y. J. Seo, K. Aranda, L. Shi, S. Battaglia-Hsu, I. Nissim, D. E. Clapham, and D. Ren. 2013. 'mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na⁺ channels to adapt to metabolic state', *Cell*, 152: 778-90.

- Capel, R. A., E. L. Bolton, W. K. Lin, D. Aston, Y. Wang, W. Liu, X. Wang, R. A. Burton, D. Bloor-Young, K. T. Shade, M. Ruas, J. Parrington, G. C. Churchill, M. Lei, A. Galione, and D. A. Terrar. 2015. 'Two-pore Channels (TPC2s) and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) at Lysosomal-Sarcoplasmic Reticular Junctions Contribute to Acute and Chronic beta-Adrenoceptor Signaling in the Heart', *J Biol Chem*, 290: 30087-98.
- Caulfield, M. P., S. Li, G. Lee, P. J. Blanche, W. A. Salameh, W. H. Benner, R. E. Reitz, and R. M. Krauss. 2008. 'Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis', *Clin Chem*, 54: 1307-16.
- Chao, Y. K., V. Schludi, C. C. Chen, E. Butz, O. N. P. Nguyen, M. Muller, J. Kruger, C. Kammerbauer, M. Ben-Johny, A. M. Vollmar, C. Berking, M. Biel, C. A. Wahl-Schott, and C. Grimm. 2017. 'TPC2 polymorphisms associated with a hair pigmentation phenotype in humans result in gain of channel function by independent mechanisms', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E8595-E602.
- Charlton-Menys, V., and P. N. Durrington. 2008. 'Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules', *Exp Physiol*, 93: 27-42.
- D'Mello, S. A., G. J. Finlay, B. C. Baguley, and M. E. Askarian-Amiri. 2016. 'Signaling Pathways in Melanogenesis', *Int J Mol Sci*, 17.
- Davis, L. C., A. J. Morgan, J. L. Chen, C. M. Snead, D. Bloor-Young, E. Shenderov, M. N. Stanton-Humphreys, S. J. Conway, G. C. Churchill, J. Parrington, V. Cerundolo, and A. Galione. 2012. 'NAADP activates two-pore channels on T cell cytolytic granules to stimulate exocytosis and killing', *Curr Biol*, 22: 2331-7.
- Dong, X. P., D. Shen, X. Wang, T. Dawson, X. Li, Q. Zhang, X. Cheng, Y. Zhang, L. S. Weisman, M. Dellling, and H. Xu. 2010. 'PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome', *Nat Commun*, 1: 38.
- Du, H., M. Heur, D. P. Witte, D. Ameis, and G. A. Grabowski. 2002. 'Lysosomal acid lipase deficiency: correction of lipid storage by adenovirus-mediated gene transfer in mice', *Hum Gene Ther*, 13: 1361-72.
- Du, H., S. Schiavi, N. Wan, M. Levine, D. P. Witte, and G. A. Grabowski. 2004. 'Reduction of atherosclerotic plaques by lysosomal acid lipase supplementation', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 147-54.
- Dubland, J. A., and G. A. Francis. 2015. 'Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism', *Front Cell Dev Biol*, 3: 3.
- Ebanks, J. P., A. Koshoffer, R. R. Wickett, S. Schwemberger, G. Babcock, T. Hakoziaki, and R. E. Boissy. 2011. 'Epidermal keratinocytes from light vs. dark skin exhibit differential degradation of melanosomes', *J Invest Dermatol*, 131: 1226-33.
- Engelhardt, Johann, and Werner Knebel. 1993. 'Konfokale Laserscanning-Mikroskopie', *Physik in unserer Zeit*, 24: 70-78.
- Favia, A., M. Desideri, G. Gambarà, A. D'Alessio, M. Ruas, B. Esposito, D. Del Bufalo, J. Parrington, E. Ziparo, F. Palombi, A. Galione, and A. Filippini. 2014. 'VEGF-induced neoangiogenesis is mediated by NAADP and two-pore channel-2-dependent Ca²⁺ signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E4706-15.
- Feil, S., B. Fehrenbacher, R. Lukowski, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, M. Schaller, and R. Feil. 2014. 'Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis', *Circ Res*, 115: 662-7.
- Fuller, B. B., D. T. Spaulding, and D. R. Smith. 2001. 'Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures', *Exp Cell Res*, 262: 197-208.
- Galione, A., S. Patel, and G. C. Churchill. 2000. 'NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs', *Biol Cell*, 92: 197-204.
- Glass, C. K., and J. L. Witztum. 2001. 'Atherosclerosis. the road ahead', *Cell*, 104: 503-16.

- Gomez-Suaga, P., B. Luzon-Toro, D. Churamani, L. Zhang, D. Bloor-Young, S. Patel, P. G. Woodman, G. C. Churchill, and S. Hilfiker. 2012. 'Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP', *Hum Mol Genet*, 21: 511-25.
- Grimm, C., L. M. Holdt, C. C. Chen, S. Hassan, C. Muller, S. Jors, H. Cuny, S. Kissing, B. Schroder, E. Butz, B. Northoff, J. Castonguay, C. A. Luber, M. Moser, S. Spahn, R. Lullmann-Rauch, C. Fendel, N. Klugbauer, O. Griesbeck, A. Haas, M. Mann, F. Bracher, D. Teupser, P. Saftig, M. Biel, and C. Wahl-Schott. 2014. 'High susceptibility to fatty liver disease in two-pore channel 2-deficient mice', *Nat Commun*, 5: 4699.
- Grimm, Christian, and Math Cuajungco. 2014. *TRPML channels and mucopolipidosis type IV*.
- Guenther, C. A., B. Tasic, L. Luo, M. A. Bedell, and D. M. Kingsley. 2014. 'A molecular basis for classic blond hair color in Europeans', *Nat Genet*, 46: 748-52.
- Guo, J., W. Zeng, Q. Chen, C. Lee, L. Chen, Y. Yang, C. Cang, D. Ren, and Y. Jiang. 2016. 'Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*', *Nature*, 531: 196-201.
- Guo, J., W. Zeng, and Y. Jiang. 2017. 'Tuning the ion selectivity of two-pore channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 1009-14.
- Han, J., P. Kraft, H. Nan, Q. Guo, C. Chen, A. Qureshi, S. E. Hankinson, F. B. Hu, D. L. Duffy, Z. Z. Zhao, N. G. Martin, G. W. Montgomery, N. K. Hayward, G. Thomas, R. N. Hoover, S. Chanock, and D. J. Hunter. 2008. 'A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation', *PLoS Genet*, 4: e1000074.
- Hockey, L. N., B. S. Kilpatrick, E. R. Eden, Y. Lin-Moshier, G. C. Brailoiu, E. Brailoiu, C. E. Futter, A. H. Schapira, J. S. Marchant, and S. Patel. 2015. 'Dysregulation of lysosomal morphology by pathogenic LRRK2 is corrected by TPC2 inhibition', *J Cell Sci*, 128: 232-8.
- Hooper, R., D. Churamani, E. Brailoiu, C. W. Taylor, and S. Patel. 2011. 'Membrane topology of NAADP-sensitive two-pore channels and their regulation by N-linked glycosylation', *J Biol Chem*, 286: 9141-9.
- Hou, L., W. J. Pavan, M. K. Shin, and H. Arnheiter. 2004. 'Cell-autonomous and cell non-autonomous signaling through endothelin receptor B during melanocyte development', *Development*, 131: 3239-47.
- Huynh, C., and N. W. Andrews. 2005. 'The small chemical vacuolin-1 alters the morphology of lysosomes without inhibiting Ca²⁺-regulated exocytosis', *EMBO Rep*, 6: 843-7.
- Ishida, Y., S. Nayak, J. A. Mindell, and M. Grabe. 2013. 'A model of lysosomal pH regulation', *J Gen Physiol*, 141: 705-20.
- Ito, S., N. Suzuki, S. Takebayashi, S. Commo, and K. Wakamatsu. 2013. 'Neutral pH and copper ions promote eumelanogenesis after the dopachrome stage', *Pigment Cell Melanoma Res*, 26: 817-25.
- Ito, S., and K. Wakamatsu. 2011. 'Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation', *Pigment Cell Melanoma Res*, 24: 63-74.
- Jahidin, A. H., T. A. Stewart, E. W. Thompson, S. J. Roberts-Thomson, and G. R. Monteith. 2016. 'Differential effects of two-pore channel protein 1 and 2 silencing in MDA-MB-468 breast cancer cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 477: 731-36.
- Jha, A., M. Ahuja, S. Patel, E. Brailoiu, and S. Muallem. 2014. 'Convergent regulation of the lysosomal two-pore channel-2 by Mg(2)(+), NAADP, PI(3,5)P(2) and multiple protein kinases', *EMBO J*, 33: 501-11.
- Jiang, Y. L., A. H. Lin, Y. Xia, S. Lee, O. Paudel, H. Sun, X. R. Yang, P. Ran, and J. S. Sham. 2013. 'Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) activates global and heterogeneous local Ca²⁺ signals from NAADP- and ryanodine receptor-gated Ca²⁺ stores in pulmonary arterial myocytes', *J Biol Chem*, 288: 10381-94.
- Kenny, E. E., N. J. Timpson, M. Sikora, M. C. Yee, A. Moreno-Estrada, C. Eng, S. Huntsman, E. G. Burchard, M. Stoneking, C. D. Bustamante, and S. Myles. 2012. 'Melanesian blond hair is caused by an amino acid change in TYRP1', *Science*, 336: 554.

- Kinnear, N. P., F. X. Boittin, J. M. Thomas, A. Galione, and A. M. Evans. 2004. 'Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1', *J Biol Chem*, 279: 54319-26.
- Kintzer, A. F., and R. M. Stroud. 2016. 'Structure, inhibition and regulation of two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*', *Nature*, 531: 258-62.
- Kocarnik, J. M., S. L. Park, J. Han, L. Dumitrescu, I. Cheng, L. R. Wilkens, F. R. Schumacher, L. Kolonel, C. S. Carlson, D. C. Crawford, R. J. Goodloe, H. H. Dilks, P. Baker, D. Richardson, T. C. Matise, J. L. Ambite, F. Song, A. A. Qureshi, M. Zhang, D. Duggan, C. Hutter, L. Hindorff, W. S. Bush, C. Kooperberg, L. Le Marchand, and U. Peters. 2015. 'Pleiotropic and sex-specific effects of cancer GWAS SNPs on melanoma risk in the population architecture using genomics and epidemiology (PAGE) study', *PLoS One*, 10: e0120491.
- Kondo, T., and V. J. Hearing. 2011. 'Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation', *Expert Rev Dermatol*, 6: 97-108.
- Kosiniak-Kamysz, A., A. Marczakiewicz-Lustig, M. Marcinska, M. Skowron, A. Wojas-Pelc, E. Pospiech, and W. Branicki. 2014. 'Increased risk of developing cutaneous malignant melanoma is associated with variation in pigmentation genes and VDR, and may involve epistatic effects', *Melanoma Res*, 24: 388-96.
- Lam, A. K., A. Galione, F. A. Lai, and S. Zissimopoulos. 2013. 'Hax-1 identified as a two-pore channel (TPC)-binding protein', *FEBS Lett*, 587: 3782-6.
- Lear, P. V., D. Gonzalez-Touceda, B. Porteiro Couto, P. Viano, V. Guymer, E. Remzova, R. Tunn, A. Chalasani, T. Garcia-Caballero, I. P. Hargreaves, P. W. Tynan, H. C. Christian, R. Nogueiras, J. Parrington, and C. Dieguez. 2015. 'Absence of intracellular ion channels TPC1 and TPC2 leads to mature-onset obesity in male mice, due to impaired lipid availability for thermogenesis in brown adipose tissue', *Endocrinology*, 156: 975-86.
- Libby, P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. 2011. 'Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis', *Nature*, 473: 317-25.
- Lin-Moshier, Y., M. V. Keebler, R. Hooper, M. J. Boulware, X. Liu, D. Churamani, M. E. Abood, T. F. Walseth, E. Brailoiu, S. Patel, and J. S. Marchant. 2014. 'The Two-pore channel (TPC) interactome unmasks isoform-specific roles for TPCs in endolysosomal morphology and cell pigmentation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 13087-92.
- Lin-Moshier, Y., T. F. Walseth, D. Churamani, S. M. Davidson, J. T. Slama, R. Hooper, E. Brailoiu, S. Patel, and J. S. Marchant. 2012. 'Photoaffinity labeling of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) targets in mammalian cells', *J Biol Chem*, 287: 2296-307.
- Lin, B. D., H. Mbarek, G. Willemsen, C. V. Dolan, I. O. Fedko, A. Abdellaoui, E. J. de Geus, D. I. Boomsma, and J. J. Hottenga. 2015. 'Heritability and Genome-Wide Association Studies for Hair Color in a Dutch Twin Family Based Sample', *Genes (Basel)*, 6: 559-76.
- Lin, P. H., P. Duann, S. Komazaki, K. H. Park, H. Li, M. Sun, M. Sermersheim, K. Gumpfer, J. Parrington, A. Galione, A. M. Evans, M. X. Zhu, and J. Ma. 2015. 'Lysosomal two-pore channel subtype 2 (TPC2) regulates skeletal muscle autophagic signaling', *J Biol Chem*, 290: 3377-89.
- Linton, M. F., P. G. Yancey, S. S. Davies, W. G. J. Jerome, E. F. Linton, and K. C. Vickers. 2000. 'The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis.' in L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer and A. Vinik (eds.), *Endotext* (South Dartmouth (MA)).
- Lu, Y., B. X. Hao, R. Graeff, C. W. Wong, W. T. Wu, and J. Yue. 2013. 'Two pore channel 2 (TPC2) inhibits autophagosomal-lysosomal fusion by alkalinizing lysosomal pH', *J Biol Chem*, 288: 24247-63.
- Manifava, M., M. Smith, S. Rotondo, S. Walker, I. Niewczas, R. Zoncu, J. Clark, and N. T. Ktistakis. 2016. 'Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids', *Elife*, 5.
- Marks, M. S. 2008. 'FIG4, Charcot-Marie-Tooth disease, and hypopigmentation: a role for phosphoinositides in melanosome biogenesis?', *Pigment Cell Melanoma Res*, 21: 11-4.

- McCartney, A. J., Y. Zhang, and L. S. Weisman. 2014. 'Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance', *Bioessays*, 36: 52-64.
- Meir, K. S., and E. Leitersdorf. 2004. 'Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 1006-14.
- Morris, G. E., P. S. Braund, J. S. Moore, N. J. Samani, V. Codd, and T. R. Webb. 2017. 'Coronary Artery Disease-Associated LIPA Coding Variant rs1051338 Reduces Lysosomal Acid Lipase Levels and Activity in Lysosomes', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37: 1050-57.
- Neely Kayala, K. M., G. D. Dickinson, A. Minassian, K. C. Walls, K. N. Green, and F. M. Laferla. 2012. 'Presenilin-null cells have altered two-pore calcium channel expression and lysosomal calcium: implications for lysosomal function', *Brain Res*, 1489: 8-16.
- Nguyen, O. N., C. Grimm, L. S. Schneider, Y. K. Chao, C. Atzberger, K. Bartel, A. Watermann, M. Ulrich, D. Mayr, C. Wahl-Schott, M. Biel, and A. M. Vollmar. 2017. 'Two-Pore Channel Function Is Crucial for the Migration of Invasive Cancer Cells', *Cancer Res*, 77: 1427-38.
- Notomi, T., Y. Ezura, and M. Noda. 2012. 'Identification of two-pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis', *J Biol Chem*, 287: 35057-64.
- Patel, S. 2015. 'Function and dysfunction of two-pore channels', *Sci Signal*, 8: re7.
- Pendse, A. A., J. M. Arbones-Mainar, L. A. Johnson, M. K. Altenburg, and N. Maeda. 2009. 'Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond', *J Lipid Res*, 50 Suppl: S178-82.
- Pereira, G. J., M. Antonioli, H. Hirata, R. P. Ureshino, A. R. Nascimento, C. Bincoletto, T. Vescovo, M. Piacentini, G. M. Fimia, and S. S. Smaili. 2017. 'Glutamate induces autophagy via the two-pore channels in neural cells', *Oncotarget*, 8: 12730-40.
- Pereira, G. J., H. Hirata, L. G. do Carmo, R. S. Stilhano, R. P. Ureshino, N. C. Medaglia, S. W. Han, G. Churchill, C. Bincoletto, S. Patel, and S. S. Smaili. 2014. 'NAADP-sensitive two-pore channels are present and functional in gastric smooth muscle cells', *Cell Calcium*, 56: 51-8.
- Pereira, G. J., H. Hirata, G. M. Fimia, L. G. do Carmo, C. Bincoletto, S. W. Han, R. S. Stilhano, R. P. Ureshino, D. Bloor-Young, G. Churchill, M. Piacentini, S. Patel, and S. S. Smaili. 2011. 'Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) regulates autophagy in cultured astrocytes', *J Biol Chem*, 286: 27875-81.
- Pitt, S. J., T. M. Funnell, M. Sitsapesan, E. Venturi, K. Rietdorf, M. Ruas, A. Ganesan, R. Gosain, G. C. Churchill, M. X. Zhu, J. Parrington, A. Galione, and R. Sitsapesan. 2010. 'TPC2 is a novel NAADP-sensitive Ca²⁺ release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and Ca²⁺', *J Biol Chem*, 285: 35039-46.
- Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow. 1992. 'Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells', *Cell*, 71: 343-53.
- Praetorius, C., C. Grill, S. N. Stacey, A. M. Metcalf, D. U. Gorkin, K. C. Robinson, E. Van Otterloo, R. S. Kim, K. Bergsteinsdottir, M. H. Ogmundsdottir, E. Magnusdottir, P. J. Mishra, S. R. Davis, T. Guo, M. R. Zaidi, A. S. Helgason, M. I. Sigurdsson, P. S. Meltzer, G. Merlino, V. Petit, L. Larue, S. K. Loftus, D. R. Adams, U. Sobhiahshar, N. C. Emre, W. J. Pavan, R. Cornell, A. G. Smith, A. S. McCallion, D. E. Fisher, K. Stefansson, R. A. Sturm, and E. Steingrimsdottir. 2013. 'A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway', *Cell*, 155: 1022-33.
- Raposo, G., and M. S. Marks. 2007. 'Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 786-97.
- Rees, J. L. 2003. 'Genetics of hair and skin color', *Annu Rev Genet*, 37: 67-90.
- Rietdorf, K., T. M. Funnell, M. Ruas, J. Heinemann, J. Parrington, and A. Galione. 2011. 'Two-pore channels form homo- and heterodimers', *J Biol Chem*, 286: 37058-62.
- Rodwell, V. W., J. L. Nordstrom, and J. J. Mitschelen. 1976. 'Regulation of HMG-CoA reductase', *Adv Lipid Res*, 14: 1-74.

- Ruas, M., K. T. Chuang, L. C. Davis, A. Al-Douri, P. W. Tynan, R. Tunn, L. Teboul, A. Galione, and J. Parrington. 2014. 'TPC1 has two variant isoforms, and their removal has different effects on endo-lysosomal functions compared to loss of TPC2', *Mol Cell Biol*, 34: 3981-92.
- Ruas, M., K. Rietdorf, A. Arredouani, L. C. Davis, E. Lloyd-Evans, H. Koegel, T. M. Funnell, A. J. Morgan, J. A. Ward, K. Watanabe, X. Cheng, G. C. Churchill, M. X. Zhu, F. M. Platt, G. M. Wessel, J. Parrington, and A. Galione. 2010. 'Purified TPC isoforms form NAADP receptors with distinct roles for Ca(2+) signaling and endolysosomal trafficking', *Curr Biol*, 20: 703-9.
- Sakurai, Y., A. A. Kolokoltsov, C. C. Chen, M. W. Tidwell, W. E. Bauta, N. Klugbauer, C. Grimm, C. Wahl-Schott, M. Biel, and R. A. Davey. 2015. 'Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment', *Science*, 347: 995-8.
- Schieder, M., K. Rotzer, A. Bruggemann, M. Biel, and C. Wahl-Schott. 2010a. 'Planar patch clamp approach to characterize ionic currents from intact lysosomes', *Sci Signal*, 3: pl3.
- Schieder, M., K. Rotzer, A. Bruggemann, M. Biel, and C. A. Wahl-Schott. 2010b. 'Characterization of two-pore channel 2 (TPCN2)-mediated Ca²⁺ currents in isolated lysosomes', *J Biol Chem*, 285: 21219-22.
- Sergin, I., T. D. Evans, and B. Razani. 2015. 'Degradation and beyond: the macrophage lysosome as a nexus for nutrient sensing and processing in atherosclerosis', *Curr Opin Lipidol*, 26: 394-404.
- Shen, D., X. Wang, and H. Xu. 2011. 'Pairing phosphoinositides with calcium ions in endolysosomal dynamics: phosphoinositides control the direction and specificity of membrane trafficking by regulating the activity of calcium channels in the endolysosomes', *Bioessays*, 33: 448-57.
- Slominski, A., J. Wortsman, P. M. Plonka, K. U. Schallreuter, R. Paus, and D. J. Tobin. 2005. 'Hair follicle pigmentation', *J Invest Dermatol*, 124: 13-21.
- Small, D. M. 1988. 'Mechanisms of reversed cholesterol transport', *Agents Actions Suppl*, 26: 135-46.
- Steinberg, B. E., K. K. Huynh, A. Brodovitch, S. Jabs, T. Stauber, T. J. Jentsch, and S. Grinstein. 2010. 'A cation counterflux supports lysosomal acidification', *J Cell Biol*, 189: 1171-86.
- Sulem, P., D. F. Gudbjartsson, S. N. Stacey, A. Helgason, T. Rafnar, M. Jakobsdottir, S. Steinberg, S. A. Gudjonsson, A. Palsson, G. Thorleifsson, S. Palsson, B. Sigurgeirsson, K. Thorisdottir, R. Ragnarsson, K. R. Benediktsdottir, K. K. Aben, S. H. Vermeulen, A. M. Goldstein, M. A. Tucker, L. A. Kiemeny, J. H. Olafsson, J. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, and K. Stefansson. 2008. 'Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans', *Nat Genet*, 40: 835-7.
- Sulem, P., D. F. Gudbjartsson, S. N. Stacey, A. Helgason, T. Rafnar, K. P. Magnusson, A. Manolescu, A. Karason, A. Palsson, G. Thorleifsson, M. Jakobsdottir, S. Steinberg, S. Palsson, F. Jonasson, B. Sigurgeirsson, K. Thorisdottir, R. Ragnarsson, K. R. Benediktsdottir, K. K. Aben, L. A. Kiemeny, J. H. Olafsson, J. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, and K. Stefansson. 2007. 'Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans', *Nat Genet*, 39: 1443-52.
- Tabas, I., and K. E. Bornfeldt. 2016. 'Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis', *Circ Res*, 118: 653-67.
- Teupser, D., A. D. Persky, and J. L. Breslow. 2003. 'Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement)', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1907-13.
- Thelen, A. M., and R. Zoncu. 2017. 'Emerging Roles for the Lysosome in Lipid Metabolism', *Trends Cell Biol*, 27: 833-50.
- Tobin, D. J. 2011. 'The cell biology of human hair follicle pigmentation', *Pigment Cell Melanoma Res*, 24: 75-88.
- Tugba Durlu-Kandilci, N., M. Ruas, K. T. Chuang, A. Brading, J. Parrington, and A. Galione. 2010. 'TPC2 proteins mediate nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)- and agonist-evoked contractions of smooth muscle', *J Biol Chem*, 285: 24925-32.

- Van Raamsdonk, C. D., G. S. Barsh, K. Wakamatsu, and S. Ito. 2009. 'Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathways', *Pigment Cell Melanoma Res*, 22: 819-26.
- Visser, M., M. Kayser, and R. J. Palstra. 2012. 'HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter', *Genome Res*, 22: 446-55.
- Walseth, T. F., Y. Lin-Moshier, P. Jain, M. Ruas, J. Parrington, A. Galione, J. S. Marchant, and J. T. Slama. 2012. 'Photoaffinity labeling of high affinity nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-binding proteins in sea urchin egg', *J Biol Chem*, 287: 2308-15.
- Wasmeier, C., A. N. Hume, G. Bolasco, and M. C. Seabra. 2008. 'Melanosomes at a glance', *J Cell Sci*, 121: 3995-9.
- Welch, C. L., Y. Sun, B. J. Arey, V. Lemaitre, N. Sharma, M. Ishibashi, S. Sayers, R. Li, A. Gorelik, N. Pleskac, K. Collins-Fletcher, Y. Yasuda, D. Bromme, J. M. D'Armiento, M. L. Ogletree, and A. R. Tall. 2007. 'Spontaneous atherothrombosis and medial degradation in Apoe^{-/-}, Npc1^{-/-} mice', *Circulation*, 116: 2444-52.
- Xu, Q. 2004. 'Mouse models of arteriosclerosis: from arterial injuries to vascular grafts', *Am J Pathol*, 165: 1-10.
- Xu, X., X. Yuan, N. Li, W. L. Dewey, P. L. Li, and F. Zhang. 2016. 'Lysosomal cholesterol accumulation in macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38^(-/-) mice', *J Cell Mol Med*, 20: 1001-13.
- Yadav, R. B., P. Burgos, A. W. Parker, V. Iadevaia, C. G. Proud, R. A. Allen, J. P. O'Connell, A. Jeshtadi, C. D. Stubbs, and S. W. Botchway. 2013. 'mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging', *BMC Cell Biol*, 14: 3.
- Yamaguchi, S., A. Jha, Q. Li, A. A. Soyombo, G. D. Dickinson, D. Churamani, E. Brailoiu, S. Patel, and S. Muallem. 2011. 'Transient receptor potential mucolipin 1 (TRPML1) and two-pore channels are functionally independent organellar ion channels', *J Biol Chem*, 286: 22934-42.
- Yamasaki, M., G. C. Churchill, and A. Galione. 2005. 'Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)', *FEBS J*, 272: 4598-606.
- Yang, H., D. G. Rudge, J. D. Koos, B. Vaidialingam, H. J. Yang, and N. P. Pavletich. 2013. 'mTOR kinase structure, mechanism and regulation', *Nature*, 497: 217-23.
- Yin, W., E. Carballo-Jane, D. G. McLaren, V. H. Mendoza, K. Gagen, N. S. Geoghagen, L. A. McNamara, J. N. Gorski, G. J. Eiermann, A. Petrov, M. Wolff, X. Tong, L. C. Wilsie, T. E. Akiyama, J. Chen, A. Thankappan, J. Xue, X. Ping, G. Andrews, L. A. Wickham, C. L. Gai, T. Trinh, A. A. Kulick, M. J. Donnelly, G. O. Voronin, R. Rosa, A. M. Cumiskey, K. Bekkari, L. J. Mitnaul, O. Puig, F. Chen, R. Raubertas, P. H. Wong, B. C. Hansen, K. S. Koblan, T. P. Roddy, B. K. Hubbard, and A. M. Strack. 2012. 'Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia', *J Lipid Res*, 53: 51-65.
- Zhang, M., F. Song, L. Liang, H. Nan, J. Zhang, H. Liu, L. E. Wang, Q. Wei, J. E. Lee, C. I. Amos, P. Kraft, A. A. Qureshi, and J. Han. 2013. 'Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans', *Hum Mol Genet*, 22: 2948-59.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda. 1992. 'Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E', *Science*, 258: 468-71.
- Zhang, Z. H., Y. Y. Lu, and J. Yue. 2013. 'Two pore channel 2 differentially modulates neural differentiation of mouse embryonic stem cells', *PLoS One*, 8: e66077.
- Zong, X., M. Schieder, H. Cuny, S. Fenske, C. Gruner, K. Rotzer, O. Griesbeck, H. Harz, M. Biel, and C. Wahl-Schott. 2009. 'The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca²⁺-release from lysosomal stores', *Pflugers Arch*, 458: 891-9.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | mikromolar |
| A | Adenin |
| Å | Ångström |
| ABC | Transporter, die eine ATP-bindende Kassette besitzen |
| ACAT | Acetyl-CoA-Acetyltransferase |
| Apo | Apolipoprotein |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| At | Arabidopsis thaliana |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| a.u. | arbitrary unit, willkürliche Einheit |
| BCA | Brachiocephalararterie |
| BGH | bovines Wachstumshormon |
| CatSper | Kationen-Kanäle von Spermien |
| C | Geschlossen/ closed |
| Ca_v | Spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanal |
| CC | Cholesterol-Kristalle |
| CD | Cluster of differentiation |
| cDNA | komplementäre DNS |
| CE | Cholesterolester |
| CFP | Cyan fluoreszierendes Protein |
| CICR | Calcium-induzierte Calciumfreisetzung |
| CMV | Cytomegalievirus |
| Co-IP | Coimmunopräzipitation |
| CSED | Cholesterolester Speicherkrankheit |
| DCT | DOPAchrome-Tautomerase |
| D_{free} | Konzentration an freiem Donor |
| dHet | Doppelt heterozygot |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Glutaminsäure |
| E_A | FRET-Effizienz |
| EC_{50} | mittlere effektive Konzentration |
| EDNRB | Endothelin-Rezeptor B |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EE | Frühes Endosom |

| | |
|------------|--|
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor, |
| EGF-R | Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors |
| E_{\max} | Maximale Effizienz |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EtOH | Ethanol |
| FBS | Fetales Rinderserum |
| FC | Freie Fettsäure |
| Fig4 | Fig4 Phosphoinositid 5-Phosphatase |
| FKBP12 | FK506 (Tacrolimus) bindendes Protein 12 |
| FRB-Domäne | FKBP12-Rapamycin-Bindungsdomäne |
| FRET | Förster-Energie-Resonanz-Transfer |
| G | Glycin |
| g | Gramm |
| gDNA | genomische DNA |
| Gly | Glycin |
| GOF | Gain of function |
| GWAS | genomweite Assoziationsstudie |
| h | human |
| Hax-1 | Mit HCLS assoziiertes X-1 |
| HCLS | Hämatopoetisches, Zell-spezifisches Lyn Substrat 1 |
| HDL | High density lipoprotein, Lipoprotein hoher Dichte |
| HEK | Human Embryonic Kidney |
| HeLa | Henrietta Lacks |
| HERC2 | E3 Ubiquitin-Protein Ligase |
| Het | Heterozygot |
| HLTF | Helicase ähnlicher Transkriptionsfaktor |
| Hom | Homozygot |
| I | Inaktiv |
| IC_{50} | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IL | Interleukin |
| IP_3 | Inositoltrisphosphat |
| IRF4 | Interferon-Regulationsfaktor |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| kb | Kilobase |
| K_{dEFF} | Dissoziationskonstante |
| KIT | Kit-Rezeptor-Tyrosinkinase |
| KITLG | Kit Ligand |
| K_v | Spannungsgesteuerter K^+ -Kanal |
| L | Leucin |
| l | Liter |

| | |
|-----------------|--|
| LAL | Lysosomale saure Lipase |
| LD | Lipidtropfen |
| LDL | Low density lipoprotein, Lipoprotein geringer Dichte |
| LDL-R | LDL-Rezeptor |
| LEF | lymphoider enhancer-binding factor |
| Leu | Leucin |
| LIPA | Gen, das für die lysosomale saure Lipase codiert |
| LRRK2 | Leucine-reiche Repeat Kinase 2 |
| m | Mus musculus |
| M | Methionin |
| mA | Milliampere |
| MATP | Membran-assoziiertes Transporter Protein |
| MC1R | Melanocortin1-Rezeptor |
| MCP | Monocytenchemotaktisches Protein |
| MCS | multiplen Klonierungsstelle |
| MEF | Embryonale Maus-Fibroblasten |
| MeOH | Methanol |
| Met | Methionin |
| Min. | Minuten |
| MITF | Microphthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mRNA | Boten-RNA |
| MTM | Myotubularin 1 |
| mTOR | mammalian / mechanistic Target of Rapamycin |
| mV | Millivolt |
| MVB | Multi vesicular body |
| N | Asparaginsäure |
| NAADP | Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NADP | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NAFLD | Nonalkoholische Fettlebererkrankung |
| Na _v | Spannungsgesteuerter Na ⁺ -Kanal |
| nCEH | Neutrale Choleserolester-Hydrolase |
| ng | Nanogramm |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NPC | Niemann-Pick C1 |
| NTR | Niederländisches Zwillingregister |
| O | Offen |

| | |
|-----------------------|---|
| OA1 | Okuläre Albinismus Typ 1; Gen, das für den G Protein-gekoppelten Rezeptor 143 kodiert |
| OCA2 | Okulokutaner Albinismus Typ 2, P-Protein |
| P38 | p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38 MAPK) |
| PCC | Korrelationskoeffizient nach Pearson |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDG | elektronendichte Granula |
| PDGF-R | Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptor |
| PEI | Polyethylenimin |
| PI(3)P | Phosphatidylinositol-3-Phosphat |
| PI(3,5)P ₂ | Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat |
| PIKfyve | Phosphoinositid Kinase vom FYVE-Typ |
| PNGase F | Peptid-N-Glykosidase F |
| R | Radius |
| Rab | Ras-related in brain, (G-Protein, GTPase) |
| Rag | GTPase, Ras-related |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RyRs | Ryanodin-Rezeptor |
| S | (Transmembran)segment |
| SDS | Natriumdodecylsulfate |
| SE | Sorting Endosom |
| SEM | Standardfehler, standard error of the mean |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SLC | Solute Carrier, Transporter |
| SMC | Glatte Muskelzelle |
| SNARE | soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor |
| SNP | einzelner Nukleotidpolymorphismus |
| SR-A | Scavenger Rezeptor A |
| Stx | Syntaxin |
| T | Thymin |
| TFAP2A | Transkriptionsfaktor AP-2 alpha |
| TG | Triglycerid |
| TMED | Tetramethylethylendiamin |
| TPC | Zwei Poren Kanal; Two Pore Channel |
| TPCs | Zwei Poren Kanäle |
| TRP | transient receptor potential |
| TRPML | transient receptor potential channel mucolipin |
| TYR | Tyrosinase |

| | |
|----------|---|
| TYRP1 | Tyrosinase-related protein |
| V | Volt bzw. Valin |
| V-ATPase | Vacuolar-type Adenosintriphosphatase |
| VLDL | Very low density lipoprotein, Lipoprotein sehr geringer Dichte |
| VSD | Voltage sensing domain |
| YFP | Gelb fluoreszierendes Protein |
| WT | Wildtyp |

7.2 Verwendete Primer

Primer zum Klonieren / für die SNP-Analyse:

| | Sequenz 5' – 3' |
|------------------|---|
| hTPC2-HindIII-FP | GAGAA AAGCTT CACCATGGCGGAACCCCAGGCGGAGTC |
| hTPC2-XhoI-RP | TCTCG CTCGAG CACCTGCACAGCCACAGGTGCG |
| hTPCN2-L484M-FP | TACTACCTGTTGGAG ATG CTGCTCAAGGTCTTT |
| hTPCN2-L484M-RP | AAAGACCTTGAGCAG CAT CTCCAACAGGTAGTA |
| mTOR-HindIII-FP | GAAA AAGCTT GCCACCATGCTTGGAACCGGACCTG |
| mTOR-NotI-RP | GAGAG GCGCGC ACCAGAAAGGGCACCAGCC |
| hTPCN2ML_gDNA-FP | GGTGTTCCTGGTGCTGGA |
| hTPCN2ML_gDNA-RP | ACAGCCTCTAGTCCTCAGGG |
| hTPCN2GE_gDNA-FP | GGCCACCTACCAGATGACT |
| hTPCN2GE_gDNA-RP | CGGACGTCACCTGCACAG |

Primer zum Sequenzieren:

| | Sequenz 5' – 3' |
|----------------|--------------------------|
| CMV-FP | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG |
| hTPC2-FP | CCTGCCTGAGTCTCTGACTTC |
| CFP-RP | CTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTC |
| mTOR-P1 | GGCCTCATGGGATTTGG |
| mTOR-P2 | GTTAGCCAGACCGCAGTGC |
| mTOR-P3 | GATGAGTTCTACCCAGCTG |
| mTOR-P4 | GATGCATTGGCTAGTGGACC |
| mTOR-P5 | GCATTTTATAGAGCTGTGC |
| mTOR-P6 | CCGAGGGCAGCAACAGTG |
| mTOR-P7 | CATATGACCCCAACCAGCC |
| ML_gDNA-Seq-FP | GAGCTGTCCACCTGTCAGG |
| ML_gDNA-Seq-RP | GCCTCGGATGCGCCTAC |
| GE_gDNA-Seq-FP | CAGTGGGAAGACGTGGCC |

Primer für Genotypisierungen:

| | Sequenz 5' – 3' |
|---------------|------------------------|
| T2-33f | TCAGACATTACAGACTCAGACC |
| T2-36r | GATGAGACCTTGTCAAGATCG |
| T2-38r | GAGTTGAAGGCTCCAAGAGC |
| ApoE_oIMR0180 | GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG |
| ApoE_oIMR0181 | TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC |
| ApoE_oIMR0182 | GCCGCCCCGACTGCATCT |

7.3 Verwendete Antikörper**Verwendete Antikörper:**

| Primär-AK | Hersteller | Verdünnung | Sekundär-AK | Verdünnung |
|--------------|-------------------------|------------|-------------|------------|
| anti-GFP | JL-8, Clontech | 1:2000 | anti-mouse | 1:2000 |
| anti-Flag M2 | Sigma F3165 | 1:2000 | anti-mouse | 1:2000 |
| anti-Rab7 | cell signaling, 2094 | 1:500 | anti-rabbit | 1:1000 |
| anti-Myc | cell signaling, 2276 | 1:2000 | anti-mouse | 1:2000 |

7.4 Publikationen

Publikationen:

Chao, Y. K*, **V. Schludi***, C. C. Chen, E. Butz, O. N. P. Nguyen, M. Muller, J. Kruger, C. Kammerbauer, M. Ben-Johny, A. M. Vollmar, C. Berking, M. Biel, C. A. Wahl-Schott, and C. Grimm. 2017. 'TPC2 polymorphisms associated with a hair pigmentation phenotype in humans result in gain of channel function by independent mechanisms', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E8595-E602.

Michalakis, S., L. Shaltiel, V. Sothilingam, S. Koch, **V. Schludi**, S. Krause, C. Zeitze, I. Audo, M. E. Lancelot, C. Hamel, I. Meunier, M. N. Preising, C. Friedburg, B. Lorenz, N. Zabouri, S. Haverkamp, M. Garcia Garrido, N. Tanimoto, M. W. Seeliger, M. Biel, and C. A. Wahl-Schott. 2014. 'Mosaic synaptopathy and functional defects in Cav1.4 heterozygous mice and human carriers of CSNB2', *Hum Mol Genet*, 23: 1538-50.

7.5 Danksagung

Nach 1856 Tagen im AK Wahl-Schott ist heute der Tag um Danke zu sagen an alle, die mich auf meinem Weg unterstützt haben. Ich bin dankbar für die Erfahrungen, die ich gesammelt und die Menschen, die ich kennengelernt habe.

Prof. Biel: Danke für die Aufnahme in Ihren Arbeitskreis und die Möglichkeit in diesem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld tätig zu sein. Besonderer Dank gilt Ihrem hervorragenden wissenschaftlichen Input.

Prof. Christian Wahl-Schott: Danke, dass ich als deine Doktorandin an diesen spannenden Themen arbeiten durfte, für die gute Zusammenarbeit und deine Anleitung zu selbständigem und wissenschaftlichem Denken.

PD Dr. Dr. Christian Grimm: Danke für deine Ideen, deine Betreuung und deinen Einsatz, mit dem du das Polymorphismen-Projekt zum Erfolg geführt hast.

Danke den *Mitgliedern meiner Prüfungskommission* für die Unterstützung: Prof. Zahler, Prof. Winter, Prof. Paintner und Prof. Frieß.

Yu-Kai Chao und Dr. Cheng-Chang Chen: Danke für die elektrophysiologischen Messungen und die erfolgreiche gemeinsame Arbeit. Ich freue mich schon auf Taiwan.

Marc Stieglitz: Danke für deine gute Laune, fürs Zuhören, fürs Korrekturlesen meiner Arbeit und für deine Kreativität bei der Erfindung neuer Spitznamen für mich.

Allen meinen *jetzigen und vergangenen Labormitgliedern:* Danke für die angenehme Stimmung, all den Spaß und die gegenseitige Hilfe in den letzten Jahren, viele lustige gemeinsame Abende und auch für das ein oder andere Gläschen Wein zur richtigen Zeit.

Meinen Kooperationspartnern *Dr. Alexandros Nicolaou und Bernd Northoff* vom Institut für Laboratoriumsmedizin: Danke fürs Vermessen der Lipoprotein-Konzentrationen und eure Hilfsbereitschaft.

Danke all meinen langjährigen Freunden außerhalb des Labors, besonders *Moni, Mona, Bine und Chrissi:* Für all die schönen Dinge, die wir gemeinsam erleben, die das Leben so lebenswert machen.

Aus tiefstem Herzen bin ich *meinen Eltern und meiner Oma* dankbar: für euren Rückhalt und die ständige Unterstützung, ohne die so vieles schwerer wäre!

Danke *an meinen Bruder Martin:* ohne dich wäre ich schon oft nicht weiter gekommen, du bist der beste große Bruder, den man sich wünschen kann.

Und Danke an einen ganz besonderen Menschen in meinem Leben: *Roman.* Dass du immer für mich da bist. You make me happy.